



Développement d'une approche amplicon sequencing pour l'estimation de la richesse lichénique en Wallonie

Mémoire présenté par Timothée Michaux en vue de l'obtention du diplôme de Master en Biologie des organismes et écologie à l'Université de Liège.

Service de réalisation du mémoire : Biologie de l'évolution et de la conservation

Promoteur : Nicolas Magain

Comité de lecture : Annick Wilmotte (UR InBioS, ULiège), Damien Ertz (Jardin Botanique de Meise)

Résumé : La demande est grande pour inclure les lichens dans les bilans de biodiversité des sites, notamment forestiers, en Wallonie, qu'il s'agisse de détecter les espèces rares dans une perspective de conservation de la nature ou d'études d'incidence, ou pour étudier l'impact de la pollution ou du réchauffement climatique. Or, ce domaine s'est très peu développé à cause de la difficulté d'identification morphologique des espèces et du manque d'expertise naturaliste. Une alternative pour contourner ces problèmes consiste à développer une approche d'amplicon sequencing pour estimer la diversité d'un site. L'amplicon sequencing a pour but de séquencer en simultanément le même gène chez un grand nombre d'organismes. Cette approche est rendue possible par la diminution importante des coûts du séquençage de nouvelle génération. Ce mémoire consiste en une étude pilote pour adapter cette méthode au contexte des forêts wallonnes. En pratique, trois personnes ont récolté des échantillons de toutes les espèces de lichens qu'ils ont visuellement identifiées pendant une heure dans trois sites wallons. Une approche de laboratoire pour extraire l'ADN et séquencer l'ITS2 de tous ces échantillons via amplicon sequencing, et de traitement bioinformatique des données (mothur, blast), a été mise en place pour obtenir la liste des espèces présentes à partir des séquences générées. Les espèces récoltées par les différents récolteurs ont été comparées pour déterminer si le protocole fonctionnait; s'il était possible d'obtenir les identifications des espèces sur base des séquences; s'il était possible d'échantillonner la diversité d'un site en une heure; si l'expérience de l'échantillonneur était importante. Les résultats montrent que le protocole fonctionne et permet d'obtenir l'identité des espèces de lichens récoltées, mais génère aussi une grande quantité de résultats supplémentaires difficiles à interpréter. L'expérience du récolteur semble peu importante, mais la durée d'une heure s'est avérée largement insuffisante. Les résultats suggèrent que des améliorations sont nécessaires, mais que l'amplicon sequencing est une solution prometteuse et financièrement réalisable pour des inventaires de lichens en Wallonie.

Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier Pr Nicolas Magain pour son soutien, sa confiance et la justesse de ses analyses. Sans toi je n'aurais jamais pu finir ce projet, merci infiniment.

Je souhaite aussi remercier mes amis qui m'ont soutenu tout au long de mes études et particulièrement Camille, qui m'a de nombreuses fois aidé à rédiger. Je souhaite aussi remercier Kamilla pour son amour et son soutien dans cette période compliquée.

Bien sûr je remercie aussi mes parents qui m'ont aidé tout du long et ont rendu possible de finir ce mémoire. Merci de votre patience et de votre compréhension.

Les moyens de calcul ont été fournis par le Consortium des Équipements de Calcul Intensif (CÉCI), financé par le Fonds de la Recherche Scientifique de Belgique (F.R.S.-FNRS) sous la convention n° 2.5020.11 et par la Région Wallonne.

Je remercie le Prof. E. Sérusiaux pour sa participation au protocole d'échantillonnage et son aide pour l'identification morphologique des spécimens.

Je remercie les conservateurs des réserves naturelles pour leurs autorisations et leur aide. Je remercie en particulier M. Jean-Michel Darcis pour son aide lors de la visite à la Heid des Gattes.

Table des matières

Introduction.....	5
1. La symbiose lichénique.....	5
2. État de conservation des lichens et menaces.....	6
3. Les lichens en Belgique.....	7
4. Les lichens et l'environnement.....	8
5. Difficulté d'identifier les lichens sur base morphologique.....	10
6. L'utilité de l'ADN pour identifier les lichens.....	10
7. Objectifs.....	13
Matériel et Méthodes.....	15
1. Récolte.....	15
1.A Sites d'étude.....	15
1.B Protocole de récolte.....	17
2. Extraction.....	18
3. Séquençage Illumina (amplicon sequencing).....	18
4. Analyse des séquences.....	18
5. Blast.....	19
Résultats et discussion.....	20
1. Récoltes.....	20
2. Extraction d'ADN.....	21
3. Séquençage.....	21
4. Identification Blast.....	23
5. Identification des photos des échantillons récoltés.....	27
6. Nombre d'espèce par échantillon, lieu et récolteur.....	29
7. Recouvrement des espèces en fonction des récolteurs.....	31
7.A Recouvrement des OTU séquencés au moins 10 fois.....	31
7.B Recouvrement des OTU séquencés au moins 1,000 fois.....	32
7.C Recouvrement des OTU séquencés au moins 10,000 fois.....	33
7.D Recouvrement des espèces vérifiées.....	34
8. Courbe d'accumulation.....	35
9. Résumé des résultats.....	36
10. Le protocole fonctionne-t-il?.....	37
11. Est-il efficace?.....	37
12. Est-il possible de développer un pipeline d'analyse des résultats suffisamment simple pour qu'il soit utilisé par une personne ayant des connaissances limitées en bio-informatique?.....	39
13. Quel est le coût par récolte ?.....	39
Conclusion.....	40
Bibliographie.....	40
Annexes.....	47

Introduction

1. La symbiose lichénique

Un lichen est un partenariat symbiotique stable et reproductible entre un champignon, le mycobionte, et un ou plusieurs partenaires photosynthétiques, le(s) photobionte(s) (une algue verte et/ou une cyanobactérie) (Lutzoni 2009). Ainsi, certains lichens sont une association simple entre un champignon et une algue, mais cette définition ne s'étend pas à tous. Des cas comme celui de *Peltigera leucophlebia* comprenant un champignon, une algue et une cyanobactérie sont communs (Sérusiaux et al. 2004). L'association n'est pas toujours stable, il existe en effet une multitude de champignons qui se lichénisent aux dépens d'un autre lichen, en le parasitant ou en lui ôtant de force son photobionte (Nash 2008). Malgré le fait que la relation symbiotique entre le champignon et le photobionte est le plus souvent décrite comme mutualiste, de par les bénéfices communs que les deux symbiontes tirent l'un de l'autre, de nombreux auteurs considèrent aussi cette relation comme un parasitisme à l'avantage du champignon. En effet, de nombreux photobiontes sont capables de vivre indépendamment de leur symbionte champignon à l'inverse des champignons lichénisés qui sont le plus souvent dépendants de la symbiose pour survivre (Ahmadjian 1993). De plus, les photobiontes capables de vivre sans leur partenaire ont une croissance significativement plus rapide sans leurs mycobiontes, suggérant que ceux-ci profitent et exploitent leurs photobiontes (Ahmadjian 1993).

En plus de la relation entre le mycobionte et son/ses photobiontes, de nombreuses études récentes mettent en évidence l'impact de nombreux organismes longtemps pensés distincts des lichens. En effet, il est désormais clair que les lichens interagissent directement avec un microbiome varié composé de bactéries et de champignons non lichénisés vivant à l'intérieur même des lichens, ou endolichéniques (Aschenbrenner et al., 2016). Des études sur plusieurs genres de lichens ont montré que ces microbiomes peuvent être spécifiques à leurs hôtes et similaires chez des lichens du même genre (Sierra 2020).

Ainsi, un lichen ne peut pas être uniquement défini comme une relation mutualiste ou comme une forme de parasitisme mais plutôt comme un ensemble complexe de relations entre champignons lichénisés, photobiontes et d'autres acteurs tels que des bactéries ou d'autres champignons non lichénisés.

Du point de vue taxonomique, le nom du mycobionte est celui qui est utilisé pour nommer le lichen. Seule une centaine d'espèces de photobiontes ont été décrites contre environ 19.000 espèces de champignons lichénisés (Lucking et al. 2017). Plus de 98% des champignons lichénisés recensés jusqu'à ce jour sont des ascomycètes et il semble que près de 42% des espèces d'ascomycètes connues soient lichénisées, soit environ une espèce de champignons sur cinq (Honegger 2008). Il existe aussi des basidiomycètes lichénisés (Kirk et al. 2008) Des études phylogénétiques ont montré que le phénomène de lichénisation s'est produit indépendamment à plusieurs reprises au cours de l'évolution. Ainsi, les lichens ne forment pas un groupe monophylétique mais plutôt un ensemble de plusieurs groupes d'organismes similaires dans leurs modes de vie. Dans le cas des lichens, la similarité vient de la symbiose avec un photobionte et de l'apport en sucre que celui-ci apporte au champignon (Lutzoni et

al., 2001). Au sein des ascomycètes, on retrouve majoritairement les champignons lichénisés dans la classe des Lecanoromycètes, mais il en existe aussi dans les Arthoniomycètes, Candelariomycètes, Dothideomycètes, Eurotiomycètes, Lichinomycètes, Leotiomycètes (Hibbett et al. 2007, Kirk. et al. 2008, Prieto et al. 2018).

Les lichens sont présents dans quasiment tous les écosystèmes terrestres, des jungles les plus denses aux déserts les plus froids ou arides (Nash 2008). En effet, des lichens endolithes sont présents dans les anfractuosités rocheuses de l'antarctique survivant à des hivers sans soleil et avec des températures allant jusqu'à -60°C (Friedmann 1982). D'autres survivent dans des déserts extrêmement arides avec des sols incroyablement pauvres (Belnap 2003), souvent grâce à des adaptations morphologiques et phénotypiques telle que l'utilisation de l'antraquinone pour résister aux forts rayonnements solaires (Gaya et al. 2015). Cette formidable capacité d'adaptation à des niches extrêmes et variées semble liée à la symbiose. En effet, dans ces écosystèmes, les mycobiontes et photobiontes ne peuvent survivre indépendamment sans l'association symbiotique que constitue le lichen (Nash 2008).

Dans la majorité des cas, le champignon est considéré comme le partenaire dominant de la symbiose. C'est lui qui forme la structure macroscopique du lichen (le thalle), s'assure de son apport en nutriments et permet sa fixation sur son substrat (Lutzoni, Miadlikowska 2009). Parmi les deux types de champignons lichénisés les plus fréquents, les ascomycètes se reproduisent en utilisant des asques et les basidiomycètes (deuxième groupe le plus fréquent) utilisent des basides. En termes morphologiques, un lichen est un champignon qui "emballe" son partenaire photobionte (Sérusiaux et al. 2004). Le champignon forme un réseau d'hyphes où se tient son symbiote qu'il entoure d'un cortex plus dur qui forme la limite avec l'environnement. La structure obtenue est un thalle. Le niveau de lichénisation varie beaucoup selon l'espèce, les moins lichénisés ont seulement quelques cellules de photobiontes intégrées presque aléatoirement dans leur tissu, là où les plus lichénisés ont des couches bien distinctes entre le cortex du mycobionte et la couche photosynthétique composée uniquement de cellules du photobionte (Nash 2008). Le thalle ainsi obtenu, bien que de formes extrêmement variables, est le meilleur outil pour l'identification morphologique d'un lichen.

2. État de conservation des lichens et menaces

Les lichens sont présents dans presque tous les écosystèmes de la planète. Leur incroyable diversité et la difficulté de leur identification morphologique rend difficile tout inventaire complet de l'état de conservation de chaque espèce. La plupart des inventaires et des études de conservation se concentrent donc sur des espèces communes ou très étudiées, laissant de nombreuses espèces rares dans l'ombre (NATO report). Toutefois, certains programmes ayant pour but de répertorier et de vérifier l'état de conservation de lichens ont été effectués et nous donnent une idée de la situation dramatique dans laquelle les lichens sont.

L'une des études les plus complètes sur le sujet est la Red List établie en Italie pour faire un inventaire de la localisation de chaque espèce et de leur risque d'extinction (Gheza et al. 2022). La Red List établie en Italie fit un inventaire national de 368 espèces de lichens épiphytes, soit 46 % de toutes les espèces recensées en Italie. Parmi ces espèces, 23 ont disparu du territoire italien ces 50 dernières années et plus de 27 % des espèces sont en danger d'extinction, avec de nombreuses espèces désormais

présentes uniquement dans une seule localité dans tout le pays (Nascimbene 2012). Cet état dramatique se voit aussi dans d'autres études celle effectuée par la COSEWIC au Canada qui a mis en évidence un déclin similaire (Allen et al 2019). Sur 112 espèces étudiées, 6 avaient disparu et 30 étaient en déclin avec des risques d'extinction, soit 32 % des espèces disparues ou menacées (NATO report). Ces études bien qu'informatives ne sont qu'à peine capables de peindre un tableau proche de la réalité, la plupart des espèces de lichens n'y sont pas répertoriées et elles ne prennent pas en compte de nombreuses espèces rares ou qui ne sont pas encore complètement identifiées. Seul le mycobionte est répertorié, il n'y a aucune étude de conservation des photobiontes et il est impossible de savoir si ceux-ci souffrent de manière similaire.

Cet état dramatique de la conservation des lichens s'explique par de nombreux facteurs fragilisant la résilience de ces espèces et par les menaces croissantes que celles-ci doivent affronter. Les lichens sont des organismes le plus souvent très spécifiques à une niche écologique. Cette spécificité impacte leur résilience et les rend très sensibles à des changements de leur environnement. Les changements anthropogéniques des forêts et des zones agricoles ont tendance à affecter disproportionnellement les lichens (Kerr and Cihlar 2004, Pykala 2019). Ceux-ci vivent souvent sur des arbres, dans les sous-bois ou sur des rochers et falaises. Malheureusement, tous ces milieux sont progressivement remplacés pour faciliter la production agricole et forestière.

Les lichens ont généralement une croissance lente et une longue espérance de vie pouvant aller jusqu'à plusieurs centaines d'années (Nash 2008). Ceci les rend d'autant plus sensibles que toute régénération d'une population perdue se compte en centaines. De nombreuses espèces qui étaient présentes dans les forêts primaires d'Europe sont désormais en déclin de par une diminution drastique de leurs habitats et une trop faible croissance des populations restantes. A cette faible croissance s'ajoutent une reproduction et une dispersion très peu efficaces, qui généralement se font de proche en proche, ce qui les rend très sensibles à la fragmentation de leur habitat. Ainsi, la disparition de toute population isolée est le plus souvent définitive (NATO report). Les lichens ont donc souvent été mis sous le statut d'espèce protégée, comme c'est le cas en Wallonie où tous les macrolichens sont partiellement protégés (repris à l'Annexe VII. Liste des espèces végétales partiellement protégées de la Loi du 12 juillet 1973 sur la conservation de la nature). Ce statut interdit tout commerce ou destruction volontaire des lichens sur le territoire wallon.

Malheureusement, les lichens sont très vulnérables face à la pollution. En effet, comme ils vivent le plus souvent dans des substrats très pauvres, ils ont tendance à exploiter toutes leurs ressources immédiates afin d'en exploiter chaque nutriment. Ceci les rend très sensibles aux pollutions de l'eau, de l'air et aux microparticules (Richardson 1988). Ces impacts de pollution n'en sont qu'au début, de par la croissance très lente des lichens il est fort possible que les conséquences de celle-ci ne se verront que dans plusieurs années.

3. Les lichens en Belgique

La Belgique compte une grande diversité de lichens de par la diversité de ses niches écologiques et de ses forêts. Elle comporte plus de 1250 espèces de lichens (Diederich et al. 2023). L'écrasante majorité est composée de Lecanormycètes avec quelques familles présentes au sein des Arthoniomycètes,

Eurotiomycètes, Candelariomycetes, Lichinomycètes. En Belgique les genres les plus représentés en fonction du nombre d'espèces recensées par genre sont *Arthonia*, *Caloplaca*, *Cladonia*, *Lecanora*, *Lepraria*, *Micarea*, *Parmelia*, *Peltigera* etc... (Diederich et al. 2023). Cette diversité de lichens est relativement faible comparée au reste du monde et même à d'autres pays européens. La Norvège par exemple possède plus de 2039 espèces (Frisch et al. 2020), la Suisse dont la superficie est similaire à celle de la Belgique compte plus de 1872 espèces (<https://swisslichens.wsl.ch/de/index.html>).

La diversité lichénique belge connue n'est pas faible pour autant. De nombreux pays de superficie similaire ont une diversité lichénique bien plus faible, l'Arménie par exemple ne possède que 422 espèces recensées (Harutyunyan et al. 2011). De même des endroits de surface bien supérieure ne possèdent souvent pas plus d'espèces répertoriées que la Belgique. Par exemple, le Glacier Bay National Park en Alaska, bien que 4 fois plus grand que la Belgique, ne compte que 831 espèces recenser (Spribille et al. 2020). Bien sûr, ces données de diversité spécifique sont encore incomplètes partout sur la planète et bien plus d'espèces vont être découvertes et cataloguées dans les années suivantes rendant toute comparaison de diversité spécifique à travers le monde extrêmement relative.

4. Les lichens et l'environnement

Il est très clair que les lichens sont sensibles à la pollution et particulièrement à la pollution de l'air. Les premiers écrits décrivant ceci datent de 1789 avec des remarques d'Erasmus Darwin, grand-père de Charles Darwin (Darwin 1789). Celui-ci remarqua l'absence de lichens autour des fonderies de cuivre. Depuis, de nombreux auteurs ont étendu la sensibilité des lichens aux fumées industrielles et notamment au dioxyde de soufre. Celui-ci est particulièrement toxique pour les lichens et est responsable d'une diminution drastique de la richesse lichénique dans les zones urbaines et industrielles depuis le début du 20ème siècle (Nash 1973). En Europe du Nord, cette diminution dramatique a progressivement ralenti avec la fin des centrales à charbon, et les niches urbaines commencent à être recolonisées. Ces changements ont été notamment remarqués en Finlande (Ranta 2001).

L'autre grande sensibilité des lichens est vis-à-vis de l'azote. L'azote est un nutriment nécessaire à tous les lichens mais il en diminue l'abondance et la diversité spécifique quand il est présent en trop grande quantité (Johansson et al. 2012). Avec l'augmentation massive de la quantité d'azote dans l'environnement ces 150 dernières années, on constate une diversification et une abondance d'espèces nitrophiles et une régression des espèces sensibles à l'azote (Johansson et al. 2012). La présence de ces espèces permet ainsi d'estimer la quantité d'azote présente dans l'environnement (Gibson et al. 2013), ce qui fait des lichens d'excellents bio-indicateurs (Bruteig 1993).

Depuis le début du 20ème siècle, de nombreux scientifiques utilisent des organismes comme indicateurs de l'état d'un écosystème ou de sa pollution. Ces espèces, dites bio-indicateurs, renseignent de par leur présence, leur absence, leur abondance ou leur état, de l'état global d'un écosystème ou de certaines caractéristiques écologiques, physico-chimiques, climatiques et des modifications engendrées par les activités anthropogéniques (Gerhardt 2011).

Les lichens sont aussi sensibles aux métaux lourds, aux éléments radioactifs et à une multitude d'autres polluants affectant la qualité de l'air (NATO report), ce qui en fait des bio-indicateurs très polyvalents. Avec l'essor du contrôle de la qualité de l'air en Europe et en Amérique du Nord, de nombreuses études mettant en place des protocoles pour utiliser les lichens comme bio-indicateurs ont été publiées (Nash and Gries 2002).

L'utilité des lichens comme bio-indicateurs est immense, en effet ils ont de nombreux avantages dont voici un résumé (NATO report) :

- Les lichens sont présents dans presque tous les environnements et sont en ce moment en train de recoloniser les zones urbaines depuis la chute des niveaux de dioxyde de soufre
- Ils sont généralement présents toute l'année ce qui permet de mesurer la pollution de manière continue
- Ils sont de par leur nature symbiotique très sensibles à la pollution car la perte du mycobionte ou du photobionte entraîne la mort du lichen.
- Ils absorbent des nutriments directement dans l'air et n'ont pas de cuticule protectrice, ce qui les rend très sensibles à la pollution de l'air.
- Ils sont capables d'accumuler de grandes quantités de métaux lourds, ce qui les rend utiles pour mesurer la pollution aux métaux lourds au cours du temps
- Il existe de nombreuses manières d'utiliser les lichens comme bio-indicateurs ce qui rend leur usage beaucoup plus flexible.

De par leur grande utilité comme bio-indicateurs, de nombreux pays, notamment ceux de l'Union Européenne (Asta et al. 2002), utilisent des lichens pour vérifier l'état de la pollution de l'air. Afin d'y parvenir, de nombreuses études de bio-monitoring sont organisées. Celles-ci se basent sur un inventaire détaillé des espèces présentes aux lieux étudiés et sur une méthode statistique pour traiter les données. De nombreuses méthodes existent mais la méthode IAP et les méthodes de Community recording sont les plus fréquemment utilisées.

En plus de la méthode purement quantitative de l'IAP, il existe des méthodes qualitatives, qui sont souvent capables de mesurer une plus grande quantité de facteurs de pollution. Là où l'IAP donne une valeur unique de pollution à chaque zone ; la méthode qualitative, souvent appelée approche communautaire ou community recordings, utilise des connaissances spécifiques à chaque espèce pour établir le degré de pollution par différents polluants en fonction de la présence ou non d'espèces dont la sensibilité est connue. Les conclusions ainsi obtenues sont beaucoup plus nuancées que celles données par un IAP. Le souci de cette méthode est qu'elle est très dépendante d'études fréquentes sur de nombreuses espèces pour mesurer leur sensibilité (Will-Wolf et al. 2002).

Le bio-monitoring des lichens est en plein essor, l'intérêt croissant du public pour les questions d'écologie et de pollution de l'air a poussé plusieurs universités à créer des protocoles de bio-monitoring. Dans nos régions, le projet le plus abouti est Lichen Go, un partenariat entre l'UCL (Université Catholique de Louvain-la-Neuve) et Paris-Sorbonne (<https://lichensgo.eu/>). Ce projet a pour objectif une démocratisation de la recherche scientifique, en offrant un protocole simple et des

formulaire d'aide afin de permettre à tout le monde de faire son propre inventaire. Ceci a un intérêt double : il offre au public un moyen de participer au progrès scientifique et offre une grande quantité de données afin de parfaire les modèles de bio-monitoring actuels.

5. Difficulté d'identifier les lichens sur base morphologique

Comme décrit précédemment, il est de plus en plus utile de faire des inventaires précis de la diversité des lichens. Que ce soit pour du bio-monitoring ou pour des études d'incidence, la demande pour l'identification de lichens a fortement augmenté. Le souci est qu'il est très difficile d'identifier un lichen. Traditionnellement, les lichens sont identifiés morphologiquement, cette méthode est à l'origine de la majorité des classifications des lichens. Cette approche est toutefois fortement remise en cause. Tout d'abord, il est difficile de faire une identification précise d'un lichen de manière morphologique, il y a peu de caractères morphologiques disponibles et ceux-ci sont souvent variables au sein de la même espèce. Ainsi, par exemple, le genre hyper-divers *Xanthoparmelia* aurait eu sa diversité surestimée à cause de la variabilité intraspécifique de certains traits morphologiques (Lumbsch 2011). De même, le faible nombre de caractères morphologiques a mené à une énorme sous-estimation de la diversité spécifique de certaines familles. Par exemple, plus de 80 espèces cryptiques (impossibles à distinguer morphologiquement) ont été découvertes au sein de la seule famille Parmeliaceae (Lumbsch 2010). Une étude récente a vu doubler la diversité au sein de la section Polydactylon du genre *Peltigera*, avec la description de 24 nouvelles espèces, la plupart cryptiques (Magain et al. 2023).

Ainsi, des outils d'identification chimiques et moléculaires ont été mis en place très tôt pour aider à l'identification et différencier certaines de ces espèces cryptiques. D'abord, des tests de chromatographie en couche mince (TLC) ont permis de distinguer certaines espèces sur base des composés chimiques qu'elles contiennent (Culberson et al. 1970). Ensuite, les méthodes moléculaires d'analyse d'ADN ont énormément évolué ces 30 dernières années et nous permettent désormais de séquencer l'intégralité du code génétique de n'importe quel échantillon. Ces outils mettent en évidence l'incroyable diversité cachée des lichens et modifient la classification taxonomique d'autrefois et ses critères morphologiques. Ainsi, toute une méthodologie nouvelle dans l'identification des champignons et des lichens a vu le jour, notamment avec l'adoption du marqueur ITS (internal transcribed spacer of nuclear ribosomal DNA) comme code-barre universel pour leur identification (Schoch et al. 2012), c'est-à-dire comme séquence d'ADN de référence pour chaque espèce. Celui-ci permet en utilisant seulement une région de l'ADN ribosomal d'identifier avec fiabilité la majorité des champignons et donc des lichens. Le locus ITS est composé de trois parties : ITS1, 5.8S et ITS2. Les régions ITS1 et ITS2 sont plus variables que le 5.8S. La base de données UNITE a été créée pour référencer l'ensemble des séquences d'ITS de référence pour les champignons (Nilsson et al. 2019)

6. L'utilité de l'ADN pour identifier les lichens

Les nombreuses difficultés associées à l'identification des lichens de manière morphologique, ainsi que la démocratisation des méthodes de séquençage génétique de nouvelle génération, ont mené à la création de nouvelles méthodes génétiques afin d'identifier les lichens (Park et al. 2018). La méthode

génétiq ue possède de nombreux avantages qui semblent en faire l'outil du futur pour l'identification des lichens. Tout d'abord, l'analyse ADN permet de distinguer des espèces cryptiques sans différences morphologiques. Elle permet aussi d'éviter de mal identifier une espèce à cause de fluctuations de ses caractères morphologiques. Elle permet non seulement d'identifier le mycobionte mais elle peut aussi permettre d'identifier le/les photobionte(s) ainsi que les éléments de son microbiome. Ceci permet de mettre en évidence des lichens composés de mycobionte et photobionte connus indépendamment l'un de l'autre mais dont la symbiose n'avait pas encore été observée. Finalement, elle permet de faciliter la tâche de l'identification (Leavitt et al 2013). En effet, l'identification morphologique est ardue pour les lichens et requiert des années de pratique et d'expertise, ce qui limite fortement le nombre de personnes pouvant faire des inventaires. De plus, cette méthode est extrêmement dépendante du protocole de récolte et de l'organisation des récolteurs. Une étude tchèque (Vondrak et al. 2016) a ainsi mis en évidence le manque de fiabilité des récoltes par des lichénologues seuls et a démontré une différence significative entre les récoltes mettant les lichénologues en compétition et celles faites traditionnellement. Ce manque de fiabilité dans les experts montre une nécessité dans le développement d'un protocole d'inventaire fiable et dépendant le moins possible de facteurs humains. La méthode génétique a l'avantage de pouvoir être réalisée par un novice, tant que l'échantillon étudié appartient à une espèce déjà documentée et que l'analyse ADN fonctionne. Le prix élevé de cette méthode a longtemps été prohibitif, mais avec la diminution des prix constatée ces dernières années avec l'amélioration de la technologie de séquençage, cette méthode est de plus en plus viable (Kircher et al. 2020).

En effet, avec le développement des méthodes de next generation sequencing (NGS) il est désormais possible de séquencer et analyser de gigantesques masses de données génétiques. Parmi ces méthodes l'amplicon sequencing est une méthode de NGS permettant de séquencer un gène ou un locus précis pour un très grand nombre d'échantillons en même temps. C'est la méthode qui sera utilisée dans ce mémoire. Le plus souvent, le gène séquencé contient une partie conservée presque à l'identique entre les espèces et une partie hypervariable avec un très haut taux de substitution (Cruaud et al. 2017). Ces caractéristiques permettent à ces gènes d'être facilement identifiables et séquençables grâce à leurs parties conservées mais permettent aussi d'identifier l'espèce séquençée grâce à leurs parties hyper variables. Les locus les plus souvent utilisés sont les loci ribosomiaux, notamment le 16S rRNA pour les bactéries, les 18S, 28S et l'ITS pour les eucaryotes, et en particulier l'ITS pour les champignons (Lundberg et al. 2013). Ainsi, cette méthode permet de séquencer un même gène pour tous les organismes présents au sein d'un échantillon contenant l'ADN de nombreuses espèces et de pouvoir en identifier les différentes espèces (Shokrala et al. 2015).

Ces caractéristiques ont fait de l'amplicon sequencing un atout majeur de l'écologie microbienne et de l'étude des communautés bactériennes dans le sol et l'eau (par exemple Hugerth et Andersson, 2017, Scholer et al. 2017). Dans ces études, de nombreux échantillons sont pris dans le sol/eau de l'environnement à étudier, l'amplicon sequencing permet alors de connaître la diversité spécifique de chaque échantillon et donc d'avoir une idée de la communauté bactérienne et des facteurs qui influencent cette diversité.

Un protocole similaire peut aussi être utilisé, en regroupant au sein d'un même échantillon plusieurs organismes récoltés séparément, ce qui permet d'identifier en une fois toutes les espèces récoltées et par exemple de faire un inventaire de la richesse spécifique d'un lieu. Par exemple, cette approche a été développée pour obtenir l'ITS d'un grand nombre de spécimens d'herbarium regroupés dans le même échantillon (Gueidan et al. 2019) C'est cette dernière approche qui fera l'objet de ce mémoire.

La méthode ADN permet donc d'identifier de nombreuses espèces mais n'est pas sans défaut. En effet l'amplicon sequencing souffre d'erreurs de séquençage, bien que de nouvelles méthodes d'analyses permettent d'en atténuer l'impact (Bokulich et al. 2013). L'amplicon sequencing a aussi tendance à séquencer bien plus que les espèces visées, des champignons parasites ou endolithiques sont souvent séquencés et polluent les résultats. Cette méthode est aussi très sensible aux contaminations et nécessite une grande rigueur dans la gestion des échantillons. Finalement elle n'est pas très utile dans les cas où l'échantillon étudié est vieux ou endommagé ou quand il est difficilement séparable de son substrat (surtout roche et écorce), situations dans lequel un expert pourrait tout de même identifier l'espèce. Enfin, elle nécessite que des séquences de référence aient déjà été produites pour le groupe d'organismes étudiés. L'utilisation de méthodes ADN pour l'identification est donc un atout de plus mais est encore loin de pouvoir remplacer l'expert et les méthodes classiques d'identification.

Avec l'amélioration des méthodes de NGS et la baisse constante des prix du séquençage, il n'est pas surprenant que de nombreux projets de barcoding (Mark et al. 2016, Mathinsen et al. 2019, Wright et al. 2019) aient vu le jour. Le barcoding est une méthode d'identification génétique n'utilisant qu'une petite séquence afin d'identifier une espèce. Cette séquence dite barcode (code-barre) permet ensuite d'identifier avec une grande fiabilité tout échantillon la contenant. Les études de barcoding permettent de mettre en place des bibliothèques de barcodes permettant d'identifier rapidement n'importe quelle séquence et de mettre en évidence les espèces inconnues. Le plus souvent, les barcodes sont choisis à partir d'une séquence qui peut être amplifiée chez un grand nombre d'espèces avec les mêmes primers, mais ayant une grande variabilité. Pour les animaux par exemple, on utilise le plus souvent l'ADN mitochondrial (Waugh, 2007). Dans le cas des champignons on utilise l'ITS. Trois études (Mark et al. 2016, Mathinsen et al. 2019, Wright et al. 2019) suivent un protocole proche de celui décrit dans ce mémoire et semblent toutes démontrer la faisabilité de ce genre de projet.

L'étude de Mark et al. (2016) est une étude pionnière dans l'identification ADN des lichens. Un total de 100 espèces de lichens suisses ont été analysés par pyrosequencing 454, et 99 d'entre eux ont pu être identifiées par leur ITS. De nombreux problèmes liés à l'analyse ADN des lichens ont été mis en évidence (contamination, chimère, présence d'autres champignons aux ITS similaires). Cette étude a toutefois démontré la faisabilité de l'identification ADN pour les lichens.

L'article de Wright et al. (2019) avait pour objectif de comparer la méthode génétique aux inventaires traditionnels avec une méthodologie similaire à celle de ce mémoire. Un lieu unique fut inventorié d'abord par des lichénologues confirmés selon une méthode morphologique, puis ce même lieu fut inventorié par un lichénologue et deux assistants non-spécialistes en lichens pendant une durée de deux heures. Après extraction et analyse de l'ADN des échantillons récoltés, un total de 72 espèces furent identifiées, contre 43 dans l'inventaire morphologique.

L'étude de Mathinsen et al. (2019) a eu pour objectif l'établissement d'une base de données précise des ITS de 507 espèces de lichens présents en Scandinavie et au Svalbard. Cette base de données a été obtenue par analyse ADN d'un grand nombre d'échantillons récoltés ainsi que d'une partie des herbarium de l'Université d'Oslo. Ces analyses ont été complétées d'une vérification morphologique. Cette étude a aussi permis la découverte de nouvelles espèces. Elle montre la possibilité d'une base de données complète de l'ITS de chaque espèce de lichen pour un territoire, permettant facilement de les identifier dans le futur.

L'essor récent de ce genre d'études vient de la standardisation du marqueur ITS pour les champignons (Xu 2016). En effet, contrairement à la plupart des espèces, les champignons lichénisés sont intimement mélangés à d'autres espèces, photobionte, microbiome, autres champignons etc... Ce qui empêche de faire des prélèvements ne contenant que le lichen étudié. L'utilisation de primers spécifiques aux champignons, mais universels pour tous les champignons, a permis de partiellement contrer ces problèmes en isolant immédiatement les champignons, dont le mycobionte, permettant un séquençage beaucoup plus aisé. Il n'y a pas de primers uniques aux champignons lichénisés et de nombreux champignons parasites et non lichénisés sont donc souvent aussi séquencés, nécessitant un nettoyage ultérieur des séquences (Mark et al. 2016).

7. Objectifs

La demande pour l'identification des lichens est en hausse constante. Que ce soit pour faire du bio-monitoring pour mesurer la pollution, pour identifier de nouvelles espèces ou pour des études d'incidence environnementale. Cette demande se heurte toutefois à une très faible offre d'expertise par des lichénologues. En effet la difficulté inhérente à l'identification des lichens par traits morphologiques (grand nombre d'espèces, peu de traits morphologiques distinctifs mais une grande variabilité de phénotypes pour les mêmes espèces) rend tout apprentissage extrêmement long et complexe. Afin de pallier cette dichotomie, cette étude propose un protocole pour faire un inventaire de la diversité spécifique d'un lieu par identification génétique. L'utilisation de données génétiques dans les inventaires biologiques a rarement été mise en place, notamment dû au coût important du séquençage. Cependant, la diminution de ces coûts au fil des ans, et le gain important en temps, et donc en argent, de cette méthode, et le manque d'expertise disponible pourrait rendre cette méthode plus avantageuse que des inventaires morphologiques.

Afin d'y parvenir, un protocole appliqué à la région wallonne a été mis en place. Des échantillons de chaque lichen visible ont été récoltés dans trois sites wallons et l'ITS2 a été séquencé par amplicon sequencing, ce qui permet de séquencer de très nombreux échantillons en même temps. Les séquences obtenues ont ensuite été analysées afin d'identifier les espèces présentes. L'objectif global est de tester la mise en place et la faisabilité d'un protocole d'amplicon sequencing pour l'inventaire de lichens en Wallonie. En particulier, nous souhaitons répondre aux questions suivantes :

1. *L'amplification simultanée des lichens récoltés va-t-elle fonctionner ?*

En effet, d'une part, la présence de nombreux composés chimiques et métabolites secondaires dans les thalles de lichens pourrait inhiber l'amplification d'ADN. Ensuite, la présence d'autres champignons dans et sur les lichens, et de contaminants pourrait compromettre l'analyse des résultats disponibles. La première question est donc tout d'abord de déterminer si la méthode d'amplicon sequencing est adaptée et va fournir des résultats exploitables.

2. *La méthode fournit-elle une liste complète des lichens récoltés ? Y-a-t-il davantage d'espèces séquencées que ce qui a été collecté ?* (soit via récolte d'espèces cryptiques, soit séquençage d'autres champignons, de spores, de fragments minuscules non-détectés...), ou moins d'espèces (une séquence d'ADN n'a pas été produite pour certaines espèces récoltées sur le terrain et présentes dans l'échantillon)

3. *Combien de temps faut-il passer sur le terrain pour espérer récolter l'essentiel de la diversité d'un site ?*

En effet, repérer l'ensemble des espèces présentes peut être une activité nécessitant beaucoup de temps. Dans le cadre de ce mémoire, vu les impératifs budgétaires, une seule durée d'échantillonnage sera testée : une heure. Trois observateurs différents vont suivre le même protocole, et nous allons comparer le recouvrement en espèces des trois récoltes pour voir si cette période est suffisante.

4. *Est-il important que la récolte soit faite par un récolteur expérimenté ? Est-ce qu'une connaissance importante en lichénologie est requise pour obtenir l'essentiel de la diversité d'un site, ce qui ne résoudrait alors pas le problème du manque d'expertise cité plus haut, ou est-ce que tout biologiste de terrain obtient le même type de résultats ?*

Pour ce faire, trois récolteurs d'expérience différente vont réaliser les récoltes : Prof. Emmanuël Sérusiaux (très expérimenté), Prof. Nicolas Magain (expérimenté) et Timothée Michaux (débutant).

5. *Est-il possible de développer un pipeline d'analyse des résultats suffisamment simple pour qu'il soit utilisé par une personne ayant des connaissances limitées en bio-informatique, et donc d'imaginer une démocratisation de ce protocole ?*

6. *Quel est le coût par site étudié ? Ce coût est-il raisonnable au vu du marché actuel des études d'incidence ?*

Matériel et Méthodes

1. Récolte

1A. Sites d'étude

Afin de réunir les échantillons nécessaires à la mise en place de ce protocole, une session de récolte a été organisée dans trois lieux choisis car ils présentent une grande diversité de lichens, afin de tester notre protocole sur un grand nombre d'espèces.

Lieu 1 : Réserve naturelle de la Heid des Gattes, (coordonnées N50.483, E5.695). Une réserve naturelle agréée à Remouchamps dans la commune d'Aywaille, gérée par Ardenne & Gaume. Elle a la particularité de contenir une ancienne carrière, ce qui offre de nombreux flancs de falaise exposés ainsi qu'une grande diversité d'arbres permettant l'existence d'une flore spécifique et d'une grande diversité de lichens.



Fig. 1 Photos de la réserve naturelle de la Heid des Gattes, credit : JM Darcis

Lieu 2 : Parc du Château de Colonster, (coordonnées N 50.579, E 5.594). Situé sur le domaine du Sart-Tilman (Liège), le site est géré par l'Université de Liège. Ce parc possède de nombreuses espèces d'arbres locaux et internationaux entourant une prairie. Cette grande diversité offre de nombreuses niches pour des lichens épiphytes.

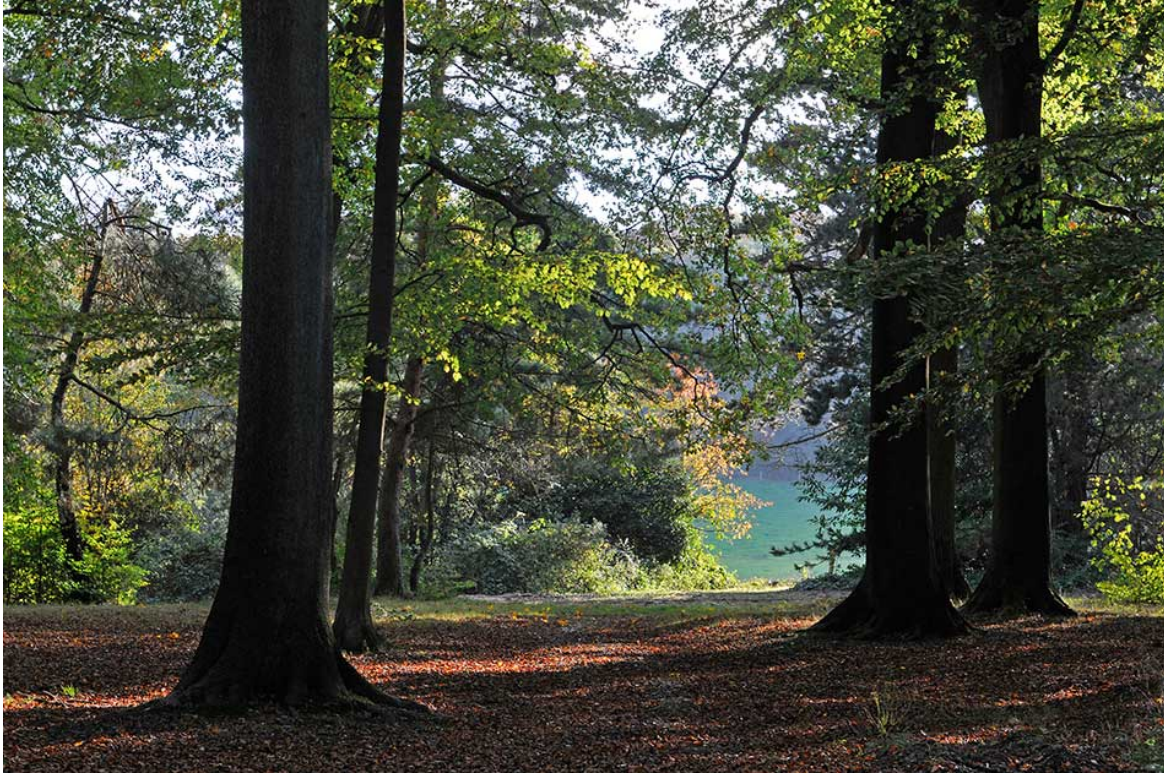


Fig. 2 Photo du parc du château de Colonster, Credit : Ville de Liège, Mr Verpoorten

Lieu 3 : Réserve naturelle de la Rochette, (coordonnées N50.583, E5.668). La Rochette est une réserve naturelle agréée gérée par Natagora près de Trooz ayant pour particularité la forte pollution du sol par des métaux lourds (plomb, zinc et cuivre). Les collines autour de Trooz y compris celles de la Rochette ont été polluées au cours du 19ème et 20ème siècles par les fumées et les déchets de l'industrie métallurgique. Ceci a entraîné l'apparition d'une flore calaminaire adaptée à cette haute pollution. Les lichens ont colonisé ces terres et y sont désormais présents en grand nombre.





Fig. 3 Photos des plaines calaminaire de la réserve de la Rochette, crédits: Natagora (<https://www.natagora.be/reserves/la-rochette>)

1B. Protocole de récolte

La récolte d'échantillons a été réalisée selon un protocole strict et identique pour chaque lieu. Trois personnes ont réalisé une récolte chacun sur chaque site : le Prof. Emmanuël Sérusiaux (ES ci-après), le Prof. Nicolas Magain (NM) et Timothée Michaux (TM). Chaque récolteur a prélevé individuellement pendant une heure afin de ne pas influencer les récoltes des autres participants. Ces trois récoltes par site ont été effectuées afin, d'une part, de comparer le recouvrement des espèces des trois récoltes pour voir s'il était imaginable d'obtenir un inventaire exhaustif d'un lieu en une heure. D'autre part, les trois récoltes ont été réalisées par des récolteurs différents pour tester si l'expérience en lichénologie du récolteur influençait la richesse spécifique obtenue.

Pour chaque lieu, un périmètre de 50m par 50m a été établi. Ce périmètre a été choisi afin d'avoir accès à de nombreux arbres et substrats. Une fois le périmètre établi, une récolte de 1 heure a eu lieu. Chaque récolteur a ramassé un échantillon par espèce qu'il identifiait sur base morphologique. Lors de la récolte, la priorité a été mise sur les lichens épiphytes et terricoles de par la facilité de leur récolte. Les lichens saxicoles n'ont pas été récoltés à cause de la limite de temps imposée par notre protocole, et le grand temps nécessaire à leur récolte à l'aide d'un marteau et d'un burin. Chaque échantillon a été mis dans un sachet individuel daté et numéroté. Une photo a aussi été prise pour chaque échantillon, afin de pouvoir comparer les résultats du séquençage des espèces récoltées avec des identifications morphologiques. Tous les sachets individuels de chaque site ont ensuite été rassemblés dans trois sacs numérotés en fonction du récolteur, soit trois sacs par lieu et neuf sacs au total.

Ces sacs ont ensuite été ramenés dans un des laboratoires de l'Institut de Botanique de l'Université de Liège. Chaque échantillon a été observé à la loupe binoculaire et un morceau d'environ 1cm² a été

découpé de chaque échantillon. Ces échantillons ont été choisis afin d'avoir le moins de contaminants possibles (terre, mousse, écorce, autres espèces etc.). Tous les échantillons d'un même sac ont ensuite été placés dans un tube de 2ml afin de réaliser l'extraction de leur ADN, soit un total de neuf tubes contenant chacun un morceau de chaque thalle récolté par l'un des trois récolteurs dans l'un des trois lieux, et numérotés ci-après en fonction du lieu et du collecteur (ES1, ES2, ES3, NM1, NM2, NM3, TM1, TM2, TM3).

2. Extraction d'ADN

L'ADN génomique total a été extrait des tubes contenant l'ensemble des échantillons d'un récolteur dans un site, pour un total de 9 tubes. Les échantillons ont d'abord été gelés pendant 10 minutes dans l'azote liquide puis broyés par vibration grâce à une bille en acier pendant 30 secondes. L'extraction d'ADN a été faite selon le protocole à base de CTAB de Cubero et al. (1999). La concentration d'ADN obtenue a été vérifiée par Nanodrop (Biospecnano, Shimadzu, Kyoto, Japon).

3. Séquençage Illumina MiSeq de l'ITS2 (amplicon sequencing)

Le séquençage de l'ITS2 a été réalisé par l'entreprise Microsynth (Balgach, Suisse). Les bibliothèques d'ADN (DNA libraries) ont été préparées par une PCR en deux étapes (two-step PCR). Le séquençage a été réalisé avec la technologie Illumina MiSeq v3. Le séquençage a été réalisé en paired-reads avec des reads (séquences) de 300 bp. Les primers utilisés ont été développés spécifiquement pour l'amplification de l'ITS2 des champignons. Le demultiplexing et le trimming des adaptateurs Illumina a été réalisé avant l'envoi des séquences.

4. Analyse des séquences

La qualité des séquences a été vérifiée avec le programme FastQC (version 0.12.0, <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>).

Ensuite, les séquences ont été analysées avec le programme Mothur (Schloss et al. 2009, version 1.48.0, <https://mothur.org/>). Les analyses ont été réalisées sur le cluster nic5 du CECI (<https://www.ceci-hpc.be/>). Les commandes utilisées sont indiquées entre parenthèses, le script complet est disponible en annexe.

Tout d'abord, les séquences forward et reverse ont été regroupées en contigs (make.contigs). Ensuite, les séquences présentant des caractères ambigus et les séquences plus longues que 350 bp ont été retirées du jeu de données (screen.seqs). Ensuite, les séquences identiques ont été fusionnées pour réduire le temps de calcul, et une table reprenant le nombre de chaque séquence a été créée (unique.seqs).

Ensuite, les séquences ont été triées par ordre d'abondance, et les séquences présentant moins de deux différences ont été fusionnées (pre.cluster). Nous avons ensuite utilisé le programme VSEARCH (Rognes et al. 2016) implémenté dans l'interface de Mothur pour détecter et retirer les séquences

chimériques (chimera.vsearch). Les séquences chimériques sont des artefacts composés de plusieurs séquences jointes ensemble. Elles se forment le plus souvent pendant la PCR, ou pendant l'assemblage des données et doivent être éliminées afin d'avoir des données fiables.

Puis nous avons téléchargé la base de données de référence des ITS2 de UNITE sous format fasta. UNITE est une base de données et un outil de gestion des séquences ITS (Nilsson et al. 2019). Il permet de facilement trier les données génétiques et d'identifier leur taxonomie (<https://unite.ut.ee/>). Nous avons utilisé cette matrice de référence pour classer nos séquences et leur donner une affiliation taxonomique (classify.seqs).

Après, nous avons généré quatre sous-ensembles de nos jeux de données, reprenant les séquences identifiées comme Lecanoromycètes, Arthoniomycètes, Candelariomycètes et Eurotiomycètes, qui sont les classes d'Ascomycètes contenant des champignons lichénisés de nos régions (la probabilité de séquencer un basidiomycète lichénisé dans les 3 lieux étant très faible).

Finalement, pour ces jeux de données (le complet et les sous-ensembles), nous avons rassemblé les séquences en OTU (operational taxonomic units) qui sont un proxy pour les espèces. Un OTU est un groupe de séquences présentant une similarité importante, au-dessus d'un seuil fixé pendant l'analyse. Ils servent d'équivalent au concept d'espèce. Nous avons utilisé la méthode AGC et une valeur de cut-off de 0.05 (cluster). Ensuite, nous avons à nouveau classé et attribué une taxonomie à chaque OTU (classify.otu) et nous avons généré un fichier final au format fasta avec une séquence unique par OTU (get.oturep).

A la fin de l'analyse par Mothur, nous disposons :

- D'un fichier avec une séquence d'ITS2 par OTU (espèce potentielle) au format fasta
- D'une identification taxonomique générée par Mothur pour chaque OTU, associée à un niveau de certitude
- D'un tableau avec les comptes des nombres de séquences de chaque OTU, par échantillon

5. BLAST

Grâce aux analyses de Mothur, quatre listes d'OTU, (Lecanoromycètes, Arthoniomycètes, Candelariomycètes, Eurotiomycètes) ont été obtenues. Ces listes dont vous pouvez voir un exemple ci-dessous (Figure 4), possèdent de nombreuses informations. Tout d'abord, le nom donné à la séquence lors de son analyse. Puis le numéro de l'OTU, celui-ci est donné à chaque OTU par ordre décroissant du nombre de fois où il a été séquencé. Ce nombre est d'ailleurs précisé juste après. On retrouve ensuite les codes de l'échantillon qui correspondent aux récolteurs et lieux d'où proviennent les séquences. Ceux-ci sont codés de la manière suivante : les initiales du récolteurs (ES Emmanuel Sérusiaux, NM Nicolas Magain et TM Timothée Michaux) suivi du lieu (1,2 et 3) ce qui nous donne un total de neuf valeurs. Finalement en dessous, on a la séquence ITS2 associée à cet OTU. Ainsi dans l'exemple présenté en Figure 4, on peut voir que l'OTU 1 a été séquencé 148.943 fois, qu'il a été récolté par tous les récolteurs dans tous les lieux, ainsi que sa séquence génétique.

```

000-KTN47_1_2104_26211_6104 Otu001|148943|ES1-ES2-ES3-NM1-NM2-NM3-TM1-TM2-TM3
TGAATTGCAGAAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGGCCCTCGGTATTCGAGGGGCGCATGCTGTTGAGCGGTCAATACACCCCTCAAGCATAGCTGGTATTGGGCTCTGCCCGCCGGGGCGTCCCGAAAAGCAGTGGCGCTCCGGTGTGACTTTAAGCGTAGTAAAT
000-KTN47_1_2111_12060_2361 Otu002|144848|ES1-ES2-ES3-NM1-NM2-NM3-TM1-TM2-TM3
TGAATTGCAGAAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGGCCCTCGGTATTCGAGGGGCGCATGCTGTTGAGCGGTCAATACACCCCTCAAGCATAGCTGGTATTGGGCTCTGCCCGCCGGGGCGTCCCGAAAAGCAGTGGCGCTCCGGTGTGACTTTAAGCGTAGTAAAT
000-KTN47_1_2114_14093_8752 Otu003|118824|ES1-ES2-ES3-NM1-NM2-NM3-TM1-TM2-TM3
TGAATTGCAGAAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGGCCCTCGGTATTCGAGGGGCGCATGCTGTTGAGCGGTCAATACACCCCTCAAGCATAGCTGGTATTGGGCTCTGCCCGCCGGGGCGTCCCGAAAAGCAGTGGCGCTCCGGTGTGACTTTAAGCGTAGTAAAT
000-KTN47_1_2110_12585_10270 Otu004|105240|ES1-ES2-ES3-NM1-NM2-NM3-TM1-TM2-TM3
TGAATTGCAGAAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGGCCCTCGGTATTCGAGGGGCGCATGCTGTTGAGCGGTCAATACACCCCTCAAGCATAGCTGGTATTGGGCTCTGCCCGCCGGGGCGTCCCGAAAAGCAGTGGCGCTCCGGTGTGACTTTAAGCGTAGTAAAT
000-KTN47_1_2114_8918_20291 Otu005|91224|ES1-ES2-ES3-NM1-NM2-NM3-TM1-TM2-TM3
TGAATTGCAGAAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGGCCCTCGGTATTCGAGGGGCGCATGCTGTTGAGCGGTCAATACACCCCTCAAGCATAGCTGGTATTGGGCTCTGCCCGCCGGGGCGTCCCGAAAAGCAGTGGCGCTCCGGTGTGACTTTAAGCGTAGTAAAT
000-KTN47_1_2111_15938_20329 Otu006|78091|ES1-ES2-ES3-NM1-NM2-NM3-TM1-TM2-TM3
TGAATTGCAGAAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGGCCCTCGGTATTCGAGGGGCGCATGCTGTTGAGCGGTCAATACACCCCTCAAGCATAGCTGGTATTGGGCTCTGCCCGCCGGGGCGTCCCGAAAAGCAGTGGCGCTCCGGTGTGACTTTAAGCGTAGTAAAT
000-KTN47_1_2107_21065_12942 Otu007|66711|ES1-ES2-ES3-NM1-NM2-NM3-TM1-TM2-TM3
TGAATTGCAGAAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGGCCCTCGGTATTCGAGGGGCGCATGCTGTTGAGCGGTCAATACACCCCTCAAGCATAGCTGGTATTGGGCTCTGCCCGCCGGGGCGTCCCGAAAAGCAGTGGCGCTCCGGTGTGACTTTAAGCGTAGTAAAT
000-KTN47_1_1117_13145_16093 Otu008|59196|ES1-ES2-ES3-NM1-NM2-NM3-TM1-TM2-TM3
TGAATTGCAGAAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGGCCCTCGGTATTCGAGGGGCGCATGCTGTTGAGCGGTCAATACACCCCTCAAGCATAGCTGGTATTGGGCTCTGCCCGCCGGGGCGTCCCGAAAAGCAGTGGCGCTCCGGTGTGACTTTAAGCGTAGTAAAT
000-KTN47_1_1101_12280_2177 Otu009|51321|ES2-NM1-NM2-NM3-TM1-TM2-TM3
TGAATTGCAGAAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGGCCCTCGGTATTCGAGGGGCGCATGCTGTTGAGCGGTCAATACACCCCTCAAGCATAGCTGGTATTGGGCTCTGCCCGCCGGGGCGTCCCGAAAAGCAGTGGCGCTCCGGTGTGACTTTAAGCGTAGTAAAT
000-KTN47_1_2103_12330_14760 Otu010|47570|ES1-ES2-NM1-NM2-NM3-TM1-TM2-TM3
TGAATTGCAGAAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGGCCCTCGGTATTCGAGGGGCGCATGCTGTTGAGCGGTCAATACACCCCTCAAGCATAGCTGGTATTGGGCTCTGCCCGCCGGGGCGTCCCGAAAAGCAGTGGCGCTCCGGTGTGACTTTAAGCGTAGTAAAT
000-KTN47_1_1113_14165_8377 Otu011|33327|ES1-ES2-ES3-NM1-NM2-TM2-TM3
TGAATTGCAGAAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGGCCCTCGGTATTCGAGGGGCGCATGCTGTTGAGCGGTCAATACACCCCTCAAGCATAGCTGGTATTGGGCTCTGCCCGCCGGGGCGTCCCGAAAAGCAGTGGCGCTCCGGTGTGACTTTAAGCGTAGTAAAT
000-KTN47_1_2110_10826_6364 Otu012|32957|ES1-NM1-NM2-NM3-TM1-TM2-TM3
TGAATTGCAGAAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGGCCCTCGGTATTCGAGGGGCGCATGCTGTTGAGCGGTCAATACACCCCTCAAGCATAGCTGGTATTGGGCTCTGCCCGCCGGGGCGTCCCGAAAAGCAGTGGCGCTCCGGTGTGACTTTAAGCGTAGTAAAT
000-KTN47_1_2114_2369_13039 Otu013|28771|ES1-ES2-ES3-NM1-NM2-NM3-TM1-TM2-TM3
TGAATTGCAGAAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGGCCCTCGGTATTCGAGGGGCGCATGCTGTTGAGCGGTCAATACACCCCTCAAGCATAGCTGGTATTGGGCTCTGCCCGCCGGGGCGTCCCGAAAAGCAGTGGCGCTCCGGTGTGACTTTAAGCGTAGTAAAT
000-KTN47_1_2113_28979_9018 Otu014|27544|ES3-NM1-NM3
TGAATTGCAGAAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGGCCCTCGGTATTCGAGGGGCGCATGCTGTTGAGCGGTCAATACACCCCTCAAGCATAGCTGGTATTGGGCTCTGCCCGCCGGGGCGTCCCGAAAAGCAGTGGCGCTCCGGTGTGACTTTAAGCGTAGTAAAT
000-KTN47_1_2116_5270_11112 Otu015|26002|ES1-ES2-ES3-NM1-NM2-NM3-TM1-TM2-TM3
TGAATTGCAGAAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGGCCCTCGGTATTCGAGGGGCGCATGCTGTTGAGCGGTCAATACACCCCTCAAGCATAGCTGGTATTGGGCTCTGCCCGCCGGGGCGTCCCGAAAAGCAGTGGCGCTCCGGTGTGACTTTAAGCGTAGTAAAT
000-KTN47_1_2107_20082_19565 Otu018|16462|ES1-ES2-ES3-NM1-NM2-TM1-TM2-TM3
TGAATTGCAGAAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGGCCCTCGGTATTCGAGGGGCGCATGCTGTTGAGCGGTCAATACACCCCTCAAGCATAGCTGGTATTGGGCTCTGCCCGCCGGGGCGTCCCGAAAAGCAGTGGCGCTCCGGTGTGACTTTAAGCGTAGTAAAT
000-KTN47_1_2104_10126_13131 Otu019|15156|ES3-NM1-NM3-TM1-TM2-TM3
TGAATTGCAGAAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGGCCCTCGGTATTCGAGGGGCGCATGCTGTTGAGCGGTCAATACACCCCTCAAGCATAGCTGGTATTGGGCTCTGCCCGCCGGGGCGTCCCGAAAAGCAGTGGCGCTCCGGTGTGACTTTAAGCGTAGTAAAT
000-KTN47_1_2115_9080_14919 Otu020|13757|NM1-NM2-NM3-TM2-TM3
TGAATTGCAGAAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGGCCCTCGGTATTCGAGGGGCGCATGCTGTTGAGCGGTCAATACACCCCTCAAGCATAGCTGGTATTGGGCTCTGCCCGCCGGGGCGTCCCGAAAAGCAGTGGCGCTCCGGTGTGACTTTAAGCGTAGTAAAT
000-KTN47_1_1109_18046_20267 Otu021|13233|ES3-NM1-NM3-TM1
TGAATTGCAGAAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGGCCCTCGGTATTCGAGGGGCGCATGCTGTTGAGCGGTCAATACACCCCTCAAGCATAGCTGGTATTGGGCTCTGCCCGCCGGGGCGTCCCGAAAAGCAGTGGCGCTCCGGTGTGACTTTAAG

```

Fig. 4 Capture d'écran d'un échantillon du fichier fasta des Lecanoromycètes

Cette séquence nous permet d'identifier à quelle espèce cet OTU est associé. Afin de vérifier les identifications taxonomiques réalisées par Mothur, nous avons réalisé un BlastN (Zhang et al. 2000, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). BLAST est un algorithme qui compare soit une suite de nucléotides (séquence d'ADN) soit une suite d'acides aminés (séquence de protéine) à une gigantesque base de données. BlastN compare les séquences de nucléotides entre elles. Elle produit alors une liste de séquences classées par score décroissant, avec l'identité de l'organisme d'où proviennent ces séquences, et un score de similarité de la séquence testée (query) avec la séquence de référence.

Un fichier excel a été généré, reprenant les résultats de Mothur et de BLAST, avec pour chaque OTU, l'espèce, le nombre de séquences, les récolteurs et lieux dans lesquels l'espèce a été. Ce tableau sert de base pour mes résultats.

Résultats et discussion

1. Récoltes

Après la récolte, les thalles récupérés par chaque récolteur dans chaque lieu ont été mis dans des tubes afin de faire l'extraction de l'ADN (Table 1). En moyenne, 23.3 thalles ont été récoltés par tube. Le tube TM2 en possède le moins avec 15 thalles et le tube NM1 en possède le plus avec 31 thalles.

Table 1. Nombre de morceaux de thalles récoltés par tube

Échantillon	TM1	TM2	TM3	ES1	ES2	ES3	NM1	NM2	NM3
Nombre de thalles	18	15	24	26	18	24	31	24	30

2. Extraction d'ADN

Après l'extraction ADN, la concentration en acide nucléique des échantillons a été vérifiée par Nanodrop. En moyenne un échantillon contient 303 ng/μ d'acide nucléique. L'échantillon TM2 a la plus faible concentration avec 95,30 ng/μ et NM1 a la plus forte avec 745,87 ng/μ. Notons qu'il s'agit des tubes contenant le plus petit et le plus grand nombre de morceaux de thalle, respectivement.

Table 2. Concentrations d'ADN de chaque échantillon mesurées par le Nanodrop

Échantillon	TM1	TM2	TM3	ES1	ES2	ES3	NM1	NM2	NM3
Acide nucléique ng/μ	379,59	95,30	235,67	143,46	151,27	290,02	745,87	474,69	217,54

3. Séquençage (Amplicon sequencing)

Table 3. Résultats séquençage amplicon sequencing, avec le nombre de séquences (reads), le nombre de nucléotides séquencés et la longueur moyenne des séquences.

	Nombre de séquences (reads)	Nombre de nucléotides	Longueur moyenne de la séquence
Min	176,473	53,007,998	300
Max	332,042	99,841,264	301
Moyenne	251,749	75,660,902	301
Médiane	261,793	78,674,703	301
Total	4,531,482	1,361,896,244	NA

Comme indiqué dans le tableau 3, le séquençage a généré un total de 4 531 482 séquences, pour un total de 1 361 896 244 bases. En moyenne, 251 749 séquences ont été générées par échantillon et par sens de séquençage.

Après le filtrage des séquences en fonction de leur qualité, leur traitement par Mothur et l'attribution d'une taxonomie aux séquences avec la base de données UNITE comme référence, les séquences se

répartissent comme suit: un total de 1 487 879 séquences de champignons ont été séquencées, parmi elles un total de 1 418 564 Ascomycètes, dont 7093 Arthoniomycètes, 15 029 Candelariomycètes, 52 503 Eurotiomycètes, 1 252 304 Lecanoromycètes, 16 595 Sordariomycètes ; ainsi que 24 605 Basidiomycètes et 107 Chytridiomycètes (fig. 5).

La majorité des séquences sont donc des Lecanoromyètes, la classe qui contient la majeure partie des champignons lichénisés. Ils représentent à eux seuls 1,252,304 séquences soit 84.1% du total des séquences de champignons. Les Candelariomycètes et Arthoniomycètes sont aussi des classes comprenant principalement des lichens. Les Eurotiomycètes sont très diversifiés : ils contiennent des champignons lichénisés, mais aussi des endophytes, ou des genres comme *Aspergillus* et *Penicillium*. Les Sordariomycètes sont aussi très diversifiés avec des champignons mycorrhiziens, endophytes ou pathogènes, mais pas de lichens. Dans ce travail je vais donc me concentrer principalement sur les Lecanoromycètes car ils représentent la majorité des séquences produites.

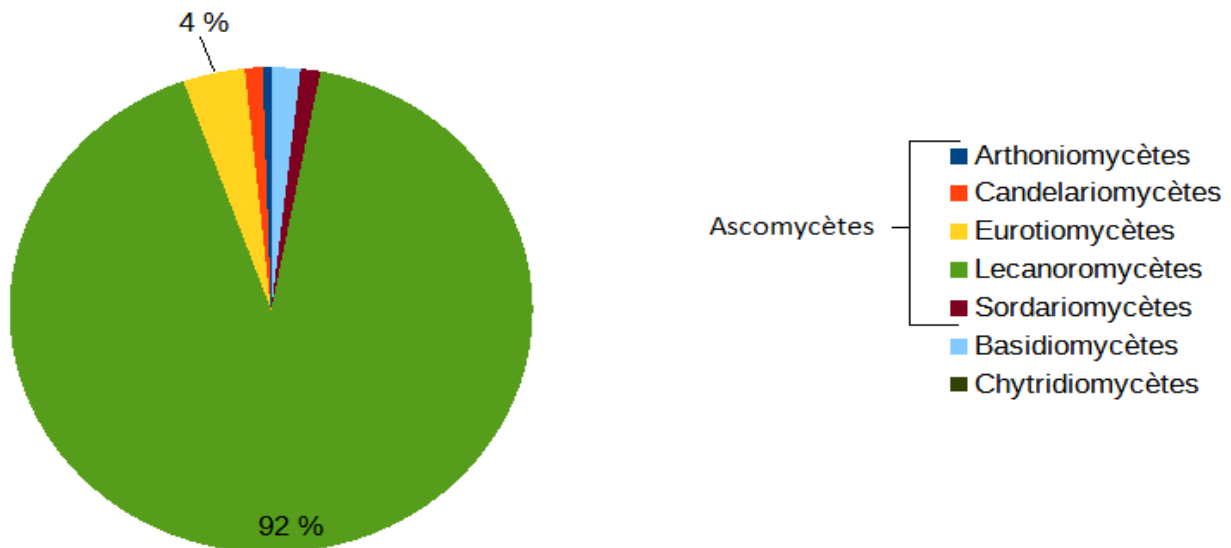


Fig. 5 Distribution des séquences de champignons produites en fonction de leur division et classe.

Après le clustering effectué par Mothur, on obtient un total de 248 OTU de Lecanoromycètes, 9 d'Arthoniomycètes, 4 de Candelariomycètes et 156 d'Eurotiomycètes dont seul 3 sont des lichens, pour un total de 264 OTU de lichens séquencés. Avec un nombre de séquences moyenne de 5,050 par OTU de Lecanoromycètes, de 795 par OTU d'Arthoniomycètes, de 3756 par OTU de Candelariomycètes et de 4227 par OTU d'Eurotiomycètes. Ces moyennes sont toutefois à prendre avec précaution, l'écart d'un OTU à un autre étant très variable, avec l'OTU le plus vu étant représenté par 148 983 séquences et plus de 150 OTU contenant moins de 5 séquences (Figure 6).

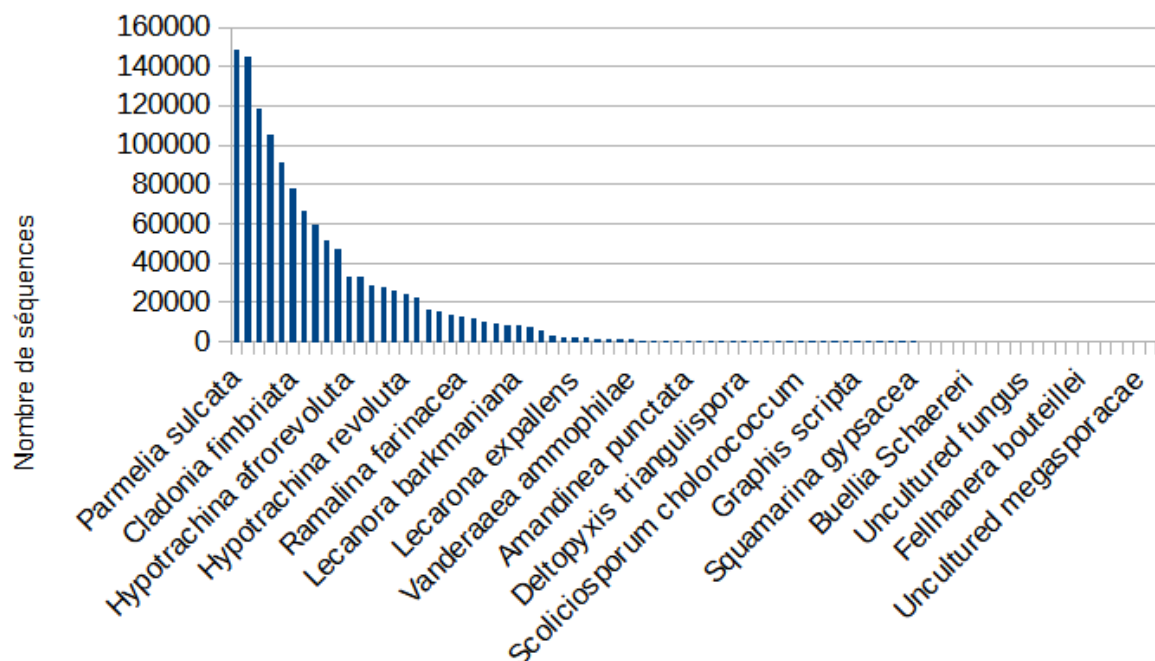


Fig. 6 Distribution du nombre de séquences par OTU dans la classe des Lecanoromycetes, du plus présent au moins présent. Ce graphique ne nomme pas chaque espèce afin de rester lisible (Voir Table 4 et Annexe 2 pour la liste complète des OTU par ordre d'abondance).

Le séquençage de tous les échantillons nous donne une liste d'espèces avec un nombre de séquences par espèce diminuant de manière exponentielle (Figure 6), avec certaines espèces séquencées plusieurs dizaines de milliers de fois et plus d'une cinquantaine d'espèces séquencées une seule fois.

4. Identification Blast

L'algorithme BlastN aussi appelé nucleotide BLAST a été utilisé pour vérifier les identifications taxonomiques de Mothur associées à chaque OTU. Pour chaque OTU, le résultat est une liste de séquences classées du meilleur au moins bon score. Le score dépend de la similarité de la séquence et du pourcentage de recouvrement entre les deux séquences. J'ai donc noté et comparé pour chaque OTU le meilleur BLAST avec l'identification réalisée par Mothur. Un exemple de résultat de BLAST peut être trouvé dans la figure 7.

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	Parmelia sulcata isolate 17934 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1...	Parmelia sulcata	549	549	100%	1e-151	100.00%	633	MN387112.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Parmelia sulcata isolate 17900 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1...	Parmelia sulcata	549	549	100%	1e-151	100.00%	636	MN387111.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Parmelia sulcata isolate 17765 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1...	Parmelia sulcata	549	549	100%	1e-151	100.00%	613	MN387109.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Parmelia sulcata isolate 17181 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1...	Parmelia sulcata	549	549	100%	1e-151	100.00%	620	MN387108.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Parmelia sulcata voucher O-L-184694 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene ...	Parmelia sulcata	549	549	100%	1e-151	100.00%	559	MK812475.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Parmelia sulcata voucher O-L-196000 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene ...	Parmelia sulcata	549	549	100%	1e-151	100.00%	559	MK812088.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Parmelia sulcata voucher O-L-196057 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene ...	Parmelia sulcata	549	549	100%	1e-151	100.00%	559	MK812065.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Parmelia squarrosa voucher MAF:Lich_20507 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed sp...	Parmelia squarrosa	549	549	100%	1e-151	100.00%	622	KX457692.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Parmelia sulcata isolate LIFU017-16 (versA) 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spa...	Parmelia sulcata	549	549	100%	1e-151	100.00%	593	KX132926.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Parmelia sulcata voucher Malicek 15747 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene ...	Parmelia sulcata	549	549	100%	1e-151	100.00%	561	QQ918728.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Parmelia sulcata voucher BLOUG24047-C11 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA ...	Parmelia sulcata	549	549	100%	1e-151	100.00%	557	KT695399.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Parmelia sulcata voucher Herb_Malicek9371 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA ...	Parmelia sulcata	549	549	100%	1e-151	100.00%	528	QQ717537.1

Fig. 7. Illustration du processus de BLAST avec l'exemple du résultat obtenu pour l'OTU 1 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

On peut voir que l'OTU 1 est associé à l'espèce *Parmelia sulcata* avec score de BLAST de $1e-151$ et un pourcentage de similarité de 100%. On peut donc affirmer que l'OTU 1 représente *Parmelia sulcata*. Malheureusement, les résultats ne sont pas toujours aussi clairs et certains OTU ne sont pas associés clairement à une espèce, soit parce que l'ITS de cette espèce n'a jamais été séquencée, soit parce que l'espèce n'a pas encore été décrite, soit parce que la séquence est un artéfact (Figure 8).

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
✓	Uncultured fungus clone B1_89 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer 1, 5.8S rib...	uncultured fungus	392	392	100%	2e-104	90.43%	606	KU579799.1
✓	Uncultured fungus clone B1_1729 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer 1, 5.8S r...	uncultured fungus	387	387	100%	9e-103	90.07%	606	KU581437.1
✓	Uncultured fungus clone B1_1189 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer 1, 5.8S r...	uncultured fungus	381	381	100%	4e-101	89.77%	609	KU580898.1
✓	Uncultured fungus clone B1_996 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer 1, 5.8S r...	uncultured fungus	381	381	100%	4e-101	89.77%	608	KU580705.1
✓	Micarea denigrata voucher O-L-174438 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA gene...	Micarea denigrata	375	375	100%	2e-99	89.67%	539	MK811696.1
✓	Uncultured fungus clone B1_346 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer 1, 5.8S r...	uncultured fungus	375	375	100%	2e-99	89.70%	587	KU580056.1
✓	Uncultured fungus clone B1_18 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer 1, 5.8S r...	uncultured fungus	375	375	100%	2e-99	89.47%	607	KU579728.1
✓	Uncultured fungus clone B1_2501 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer 1, 5.8S r...	uncultured fungus	374	374	100%	7e-99	89.47%	605	KU582202.1
✓	Uncultured fungus clone B1_1135 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer 1, 5.8S r...	uncultured fungus	374	374	100%	7e-99	89.47%	618	KU580844.1
✓	Uncultured fungus clone B1_1933 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer 1, 5.8S r...	uncultured fungus	370	370	100%	9e-98	89.14%	606	KU581640.1
✓	Arctoparmelia centrifuga isolate A42 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spac...	Arctoparmelia ce...	368	368	100%	3e-97	89.04%	770	MK589339.1
✓	Arctoparmelia centrifuga isolate A46 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spac...	Arctoparmelia ce...	368	368	100%	3e-97	89.04%	772	MK589338.1
✓	Micarea nigella voucher PRA-Palice30266 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribe...	Micarea nigella	368	368	100%	3e-97	89.04%	1793	OQ717948.1
✓	Fellhaneropsis almquistorum voucher PRA-Palice30195 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence: inte...	Fellhaneropsis al...	368	368	100%	3e-97	89.11%	934	OQ717842.1

Fig. 8. Illustration du processus de BLAST avec l'exemple du résultat obtenu pour l'OTU 73 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

Dans ce cas-ci, l'identification de l'espèce n'est pas possible par BLAST. On peut voir que les premiers résultats trouvés par BLAST correspondent à des séquences qui n'ont pas été identifiées taxonomiquement (uncultured fungus, en général ces séquences proviennent de séquençage environnemental). Ceux-ci ne sont pas associés à une espèce et ne nous aident pas à connaître l'identité de l'espèce séquencée. Le premier résultat exploitable est à la ligne cinq. On peut voir que l'espèce connue à la séquence la plus similaire est *Micarea denigrata* avec un pourcentage de similarité de 89,67% est un score de $4e-101$. Avec un pourcentage de similarité aussi faible, il est impossible de déterminer l'identité de l'espèce en question. Tout au plus pouvons-nous supposer le genre ou la famille.

Parmi la liste d'OTU des Lecanoromycètes obtenus après l'identification, 3 espèces de champignons parasites ont été détectés et retirés de notre analyse car non-lichénisés, ainsi que 5 espèces d'algues qui ont été séquencées et n'ont pas été éliminées par le filtre taxonomique de Mothur par erreur. De plus, parmi les Eurotiomycètes, 153 OTU ont été retirés car ils étaient soit des endophytes, des espèces endolichéniques ou des contaminants, ne laissant que 3 OTU de lichen. Les espèces ayant été séquencées moins de dix fois, soit 184 OTU ont aussi été enlevées du jeu de données. En effet, nous avons jugé que ces espèces, bien que sans doute présentes dans l'environnement, ne pouvaient pas correspondre aux espèces récoltées mais plutôt des espèces présentes sous formes de spores ou de

minuscules fragments, des contaminations ou erreurs de séquençage. Finalement, parmi les espèces au-dessus de 10 séquences, on a 4 espèces représentées par 2 OTU ou plus: *Lecidella elaeochroma*, *Evernia prunastri*, *Micarea denigrata*, *Scoliciosporum cholorococcum*. Dans ces cas, il est probable que l'algorithme de Mothur ait été trop strict dans la délimitation des OTU et que les deux OTU correspondent bien à la même espèce.

Après le nettoyage des données, on se retrouve avec 83 espèces lichénisées de Lecanoromycètes, 6 d'Arthoniomycètes, 4 de Candelariomycètes et 3 d'Eurotiomycètes. Ceci semble être bien supérieur à la diversité des échantillons récoltés (Table 1). Une liste complète des espèces identifiées se trouve en annexe, et un version contenant toutes les espèces séquencées plus de 1,000 fois se trouve ci-dessous (Table 4).

Table 4. Tableau contenant toutes les OTU séquencées plus de 1,000 fois, par ordre d'abondance, avec leur nombre de séquençage, le lieu et le récolteur, ainsi que l'identification taxonomique.

Nombre de séquences	ES1	NM1	TM 1	ES2	NM2	TM 2	ES3	NM3	TM 3	Total	Nom d'espèce
148943	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9	<i>Parmelia sulcata</i>
144848	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9	<i>Physcia adscendens</i>
118824	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9	<i>Flavoparmelia caperata</i>
105240	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9	<i>Lecidella elaeochroma</i>
91224	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9	<i>Punctelia subrudecta</i>
78091	1	1	1	1	1	1	1	1	0	8	<i>Cladonia fimbriata</i>
66711	1	1	1	1	1	1	1	1	0	8	<i>Physconia enteroxantha</i>
59196	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9	<i>Lecanora chlarotera</i>
51321	0	1	1	1	1	1	0	1	1	7	<i>Melanelixia glabrata</i>
47570	1	1	1	1	1	1	0	1	1	8	<i>Xanthoria parietina</i>
33327	1	1	0	1	1	1	1	0	1	7	<i>Hypotrachyna afrorevoluta</i>
32957	1	1	1	0	1	1	0	1	1	7	<i>Evernia prunastri</i>
28771	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9	<i>Phlyctis argena</i>
27544	0	1	0	0	0	0	1	1	0	3	<i>Hypogymnia physodes</i>
26002	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9	<i>Phaeophyscia ciliata</i>
24375	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9	<i>Hypotrachyna revoluta</i>
22317	0	1	1	1	0	1	0	1	0	5	<i>Cladonia humilis</i>

16462	1	1	1	1	1	1	1	0	1	8	<i>Phaeophyscia orbicularis</i>
15156	0	1	1	0	0	0	1	1	1	5	<i>Parmotrema perlatum</i>
13757	0	1	0	0	1	1	0	1	1	5	<i>Parmelina tiliacea</i>
13233	0	1	1	0	0	0	1	1	0	4	<i>Ramalina farinacea</i>
11837	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	<i>Physcia aipolia</i>
10159	0	0	1	0	0	0	0	1	0	2	<i>Rhizocarpon petraeum</i>
9032	0	0	1	0	0	0	0	1	0	2	<i>Protoparmeliopsis muralis</i>
8805	0	1	0	0	1	0	0	1	0	3	<i>Lepraria finkii</i>
8646	1	1	0	1	1	1	1	1	1	8	<i>Candelaria</i> sp.
7952	1	1	1	1	0	1	1	1	1	8	<i>Lecanora barkmaniana</i>
7621	1	0	0	1	1	1	1	0	0	5	<i>Normandina pulchella</i>
7596	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9	<i>Bacidina flavoleprosa</i>
6813	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9	<i>Pseudoschismatomma rufescens</i>
5421	0	1	0	0	1	1	1	1	0	5	<i>Lepraria incana</i>
4462	1	1	1	1	0	1	1	1	1	8	<i>Psoroglanea</i> sp.
3264	1	1	0	0	0	0	1	1	0	4	<i>Candelaria concolor</i>
3176	1	0	1	0	0	0	0	1	1	4	<i>Lecanora carpinea</i>
2553	1	0	0	0	1	1	1	1	0	5	<i>Lecanora compallens</i>
2345	1	1	0	0	1	1	1	1	0	6	<i>Lecanora expallens</i>
2262	1	1	1	1	0	1	1	1	1	8	<i>Verrucula</i> sp.
2213	1	1	0	0	1	0	0	1	0	4	<i>Candelaria</i> sp.
2080	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9	<i>Lepraria rigidula</i>
1575	1	0	1	1	1	1	1	1	1	8	<i>Caloplaca obscurella</i>
1528	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	<i>Usnea esperantiana</i>
1460	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9	<i>Bacidina chlorotricula</i>

Toutes les espèces dans le tableau 4 sont des Lecanoromycètes à l'exception de *Pseudoschismatomma rufescens* qui est un Arthoniomycète, de *Normandina pulchella*, *Psoroglanea* sp. et *Verrucula* sp. qui sont des Eurotiomycètes, ainsi que de *Candelariella concolor* et *Candelariella* sp. qui sont des Candelariomycètes.

A ce stade, je peux donc répondre à ma première question de recherche qui était « L'amplification simultanée des lichens récoltés va-t-elle fonctionner ? ». La réponse est positive, j'ai bien obtenu un grand nombre de séquences de champignons lichénisés différents via l'amplicon sequencing MiSeq

5. Identification des photos des échantillons récoltés

Lors de la récolte des échantillons, des photos ont été prises de chaque morceau de thalle récolté (cf annexe 3). Avec l'aide et l'expertise des Prof. Magain et Sérusiaux, nous avons pu identifier morphologiquement la grande majorité des espèces récoltées sur le terrain. Aucune espèce n'a été récoltée (photographiée) sans être séquencée. Toutefois, comme on s'y attendait, toutes les espèces séquencées n'ont pas été prises en photo, ce qui indique qu'elles se sont retrouvées dans les tubes de façon « indirecte ». Les espèces ayant été séquencées et aussi identifiées par les photos seront appelées ici espèces « vérifiées ».

Il semblerait que la proportion d'espèces vérifiées augmente en fonction du nombre de séquences minimales choisies pour sélectionner les OTU à prendre en compte. En d'autres termes, plus un OTU a été séquencé un grand nombre de fois, plus il y a de chances que nous l'ayons pris en photo. Ceci confirme d'une part que les espèces récoltées volontairement correspondent aux OTU représentées par le plus grand nombre de séquences, et d'autre part qu'il y a des espèces qui ont été séquencées sans que nous les ayons récoltées volontairement et prises en photo. Dans certains cas, on ne peut pas exclure que certains morceaux de thalle aient été récoltés et que la photo correspondante n'ait pas été prise, par oubli ou par problème technique.

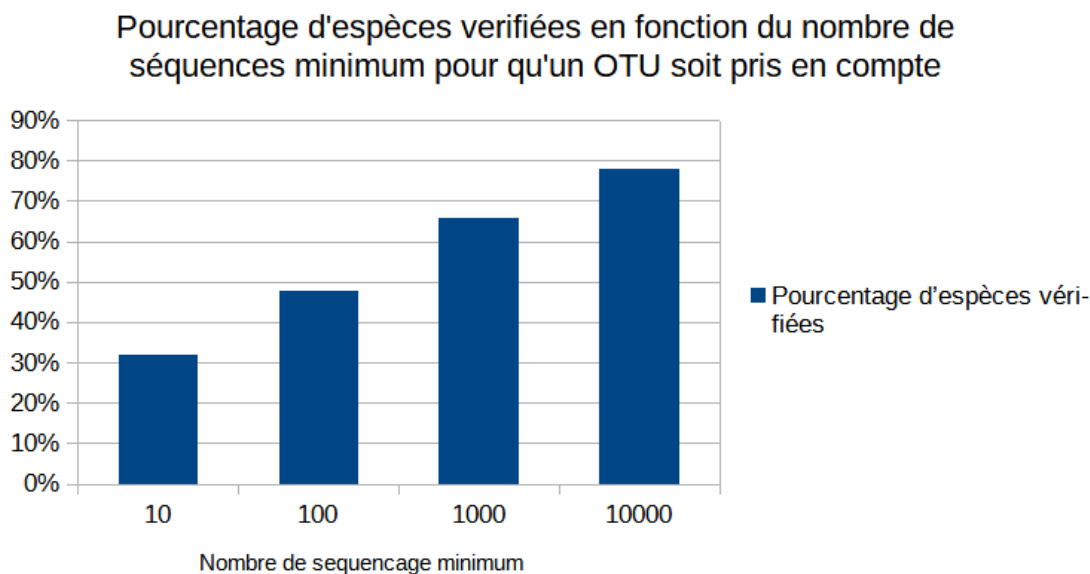


Fig. 9 Pourcentage d'espèces vérifiées (prise en photo sur le terrain) en fonction du nombre de séquences minimum pour qu'un OTU donné soit pris en compte.

Cette augmentation semble logarithmique puisqu'elle apparaît linéaire lorsque le nombre de séquences augmente de façon exponentielle, jusqu'à atteindre 78% des espèces séquencées en considérant les OTU séquencées un minimum de 10.000 fois.

Ceci s'explique par la répartition des espèces vérifiées en fonction de leur nombre de séquençage. Les espèces vérifiées sont essentiellement présentes parmi les plus séquencées, et leur proportion diminue en fonction du nombre de séquençage (Figure 9). L'espèce prise en photo la moins séquencée est peut-être *Physconia grisea* qui a été séquencée 400 fois sur 3 lieux pour une moyenne de 133 séquençage par lieu, mais la photo pourrait correspondre aussi à *Physconia enteroxantha*, séquencée 66 711 fois. L'espèce prise en photo de façon non ambiguë séquencée le plus petit nombre de fois est *Peltigera praetextata*, collectée uniquement dans l'échantillon NM1 et séquencée 870 fois. A l'inverse, les espèces ayant été séquencées le plus de fois sans avoir été prises en photo sont *Rhizocarpon petraeum* et *Protoparmeliopsis muralis*, séquencées 9032 et 8805 fois respectivement, et toutes les deux présentes dans les échantillons NM3 et TM1.

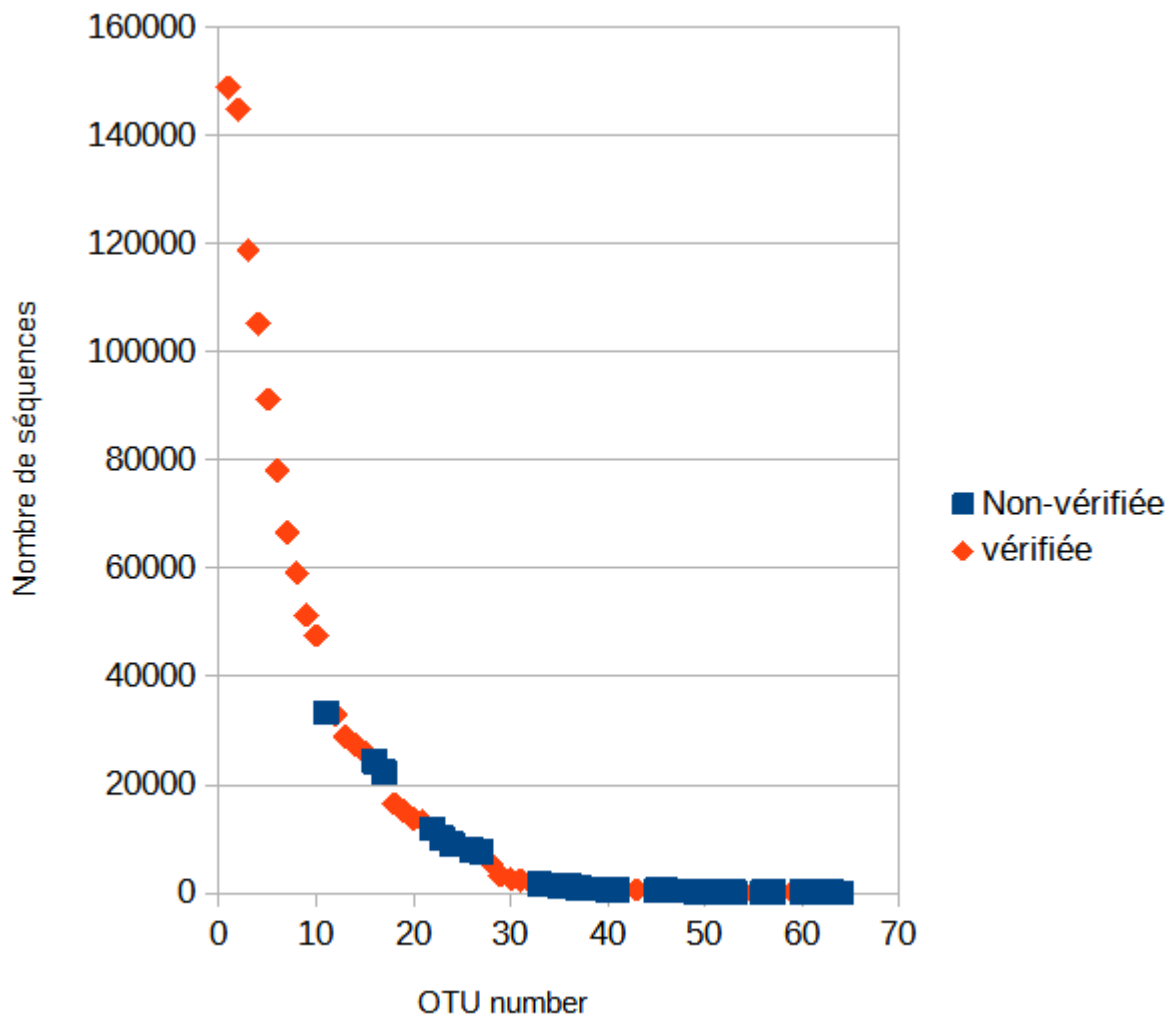


Fig. 10 Nombre de séquençage par OTU avec les OTU vérifiées (prises en photo) représentées par des losanges oranges et les OTU non vérifiées par des carrés bleus.

6. Nombre d'OTU par échantillon, lieu et récolteur

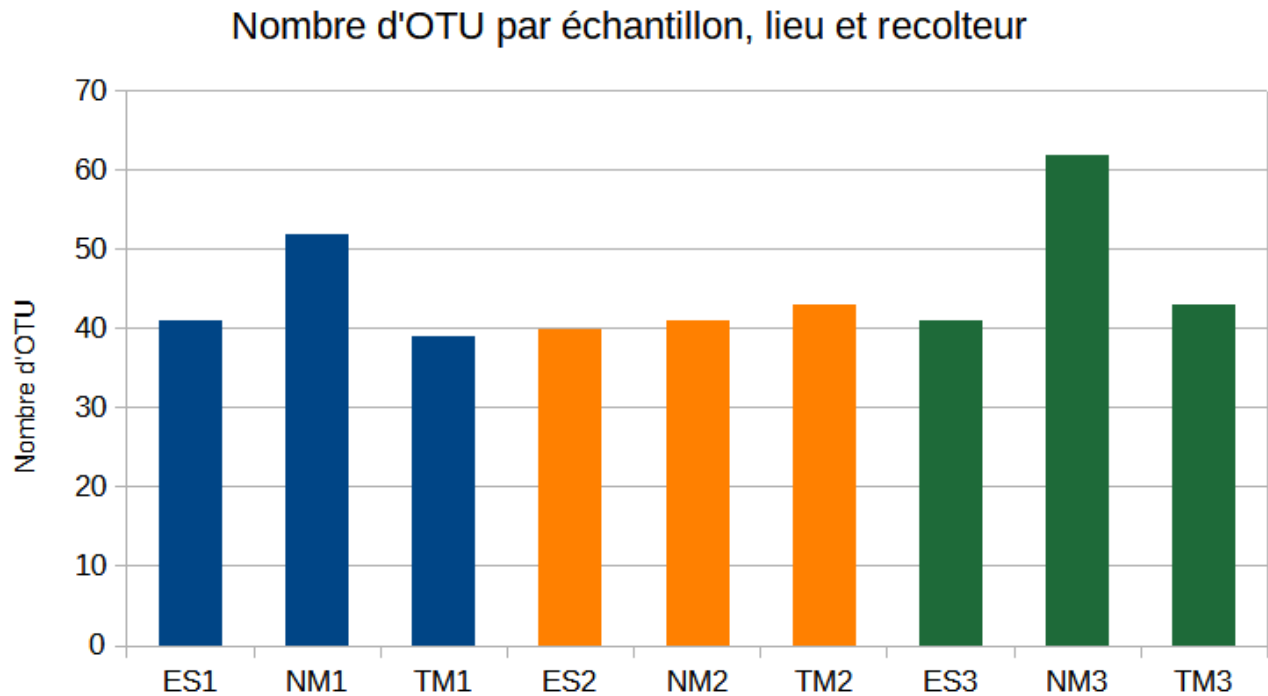


Fig. 11 Nombre d'OTU séquencées plus de 10 fois par échantillon, lieu et récolteur. ES pour Emmanuël Sérusiaux, NM pour Nicolas Magain, TM pour Timothée Michaux. Lieu 1 pour la réserve de la Heid des Gattes, 2 pour le château de Colonster et 3 pour la réserve de la Rochette.

La figure 11 ci-dessus montre le nombre d'OTU par échantillon, lieu et récolteur pour les OTU séquencées plus de 10 fois. On peut voir que le nombre d'espèces séquencées par échantillon est sensiblement le même pour tous, avec les échantillons NM1 et NM3 légèrement plus diversifiés. Similairement, pour les lieux on trouve des résultats similaires pour chacun, avec le lieu 2 (château de Colonster) contenant un peu moins d'espèces. Finalement, on peut voir que ES et TM ont un nombre similaire d'espèces, mais que NM a récolté une trentaine d'espèces en plus. Ces résultats montrent une certaine homogénéité entre les différentes récoltes.

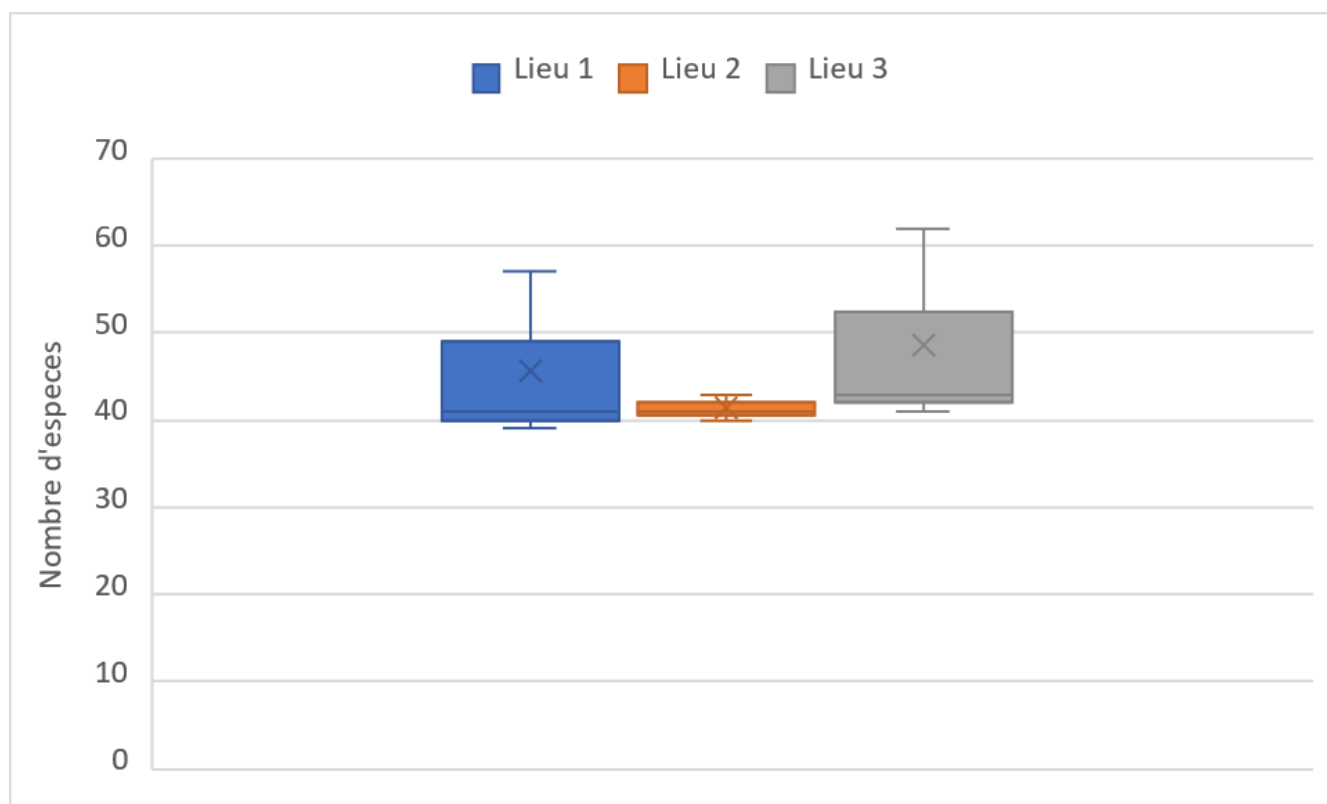


Fig. 12 Boxplot du nombre d'OTU par lieu, la croix représente la moyenne, la barre dans les boîtes représente la médiane, les boîtes donnent les quartiles et les moustaches montrent les limites des données.

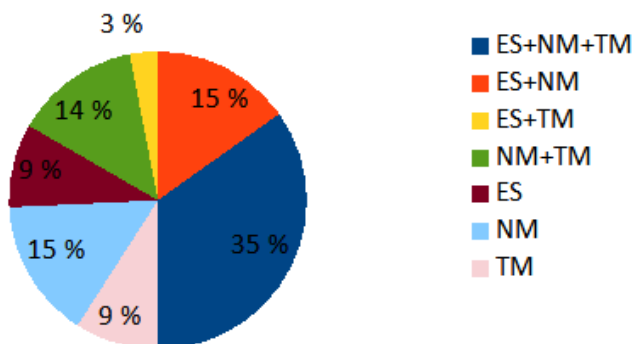
La variance du nombre d'OTU pour chaque lieu est faible, particulièrement pour le lieu 2 (Figure 12). De plus, la médiane et moyenne de chaque lieu sont aussi très proches, montrant une certaine homogénéité entre chaque récolte.

Pour rappel, le nombre de morceaux de thalles par tube oscillait entre 15 et 31 (Table 1). On a donc plus d'espèces séquencées que d'espèces récoltées. A ce stade, nous pouvons tenter de répondre à notre deuxième question de recherche : « La méthode fournit-elle une liste complète des lichens récoltés ? Y-a-t-il davantage d'espèces séquencées que ce qui a été collecté ? ». Il semble que la méthode fournit l'identité de tous les lichens récoltés « intentionnellement ». La liste contient également nettement plus d'espèces que ce que nous avons récolté. Soit parce que les espèces étaient présentes sur le terrain, mélangées avec ce que nous avons récolté, soit via des artefacts de séquençage.

7. Recouvrement des OTU entre récolteur

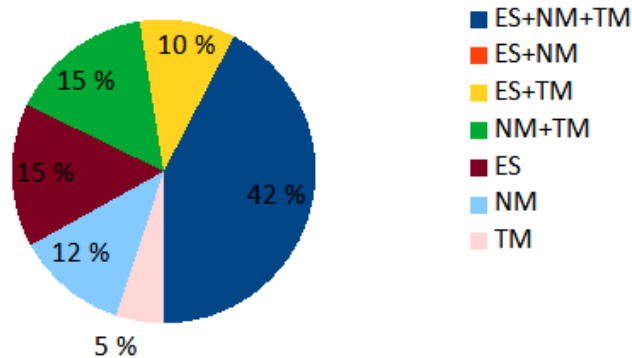
7.A Recouvrement des OTU séquencées plus de 10 fois

Recouvrement entre récolteurs lieu 1



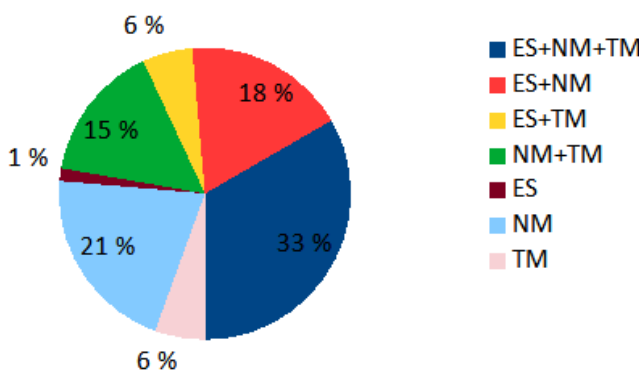
A.

Recouvrement entre récolteurs lieu 2



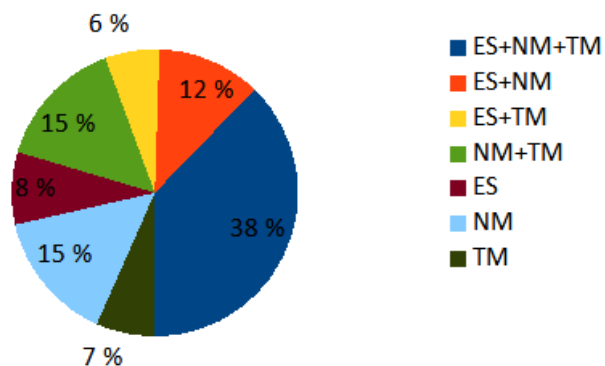
B.

Recouvrement entre récolteurs lieu 3



C.

Recouvrement tous lieux compris



D.

Fig. 13 Répartition des espèces avec plus de 10 séquences en fonction de qui les a récoltées, avec pour chaque part le pourcentage qu'elle représente. A. Lieu 1, B. Lieu 2, C. Lieu 3 et D. la moyenne des trois lieux. ES+NM+TM représente les espèces récoltées par tous les récolteurs. ES+NM représente les espèces trouvées uniquement par Emmanuel Sérusiaux et Nicolas Magain. ES+TM pour Emmanuel Sérusiaux et Timothée Michaux, NM+TM pour Nicolas Magain et Timothée Michaux. ES, NM et TM pour les espèces trouvées seulement par un seul récolteur.

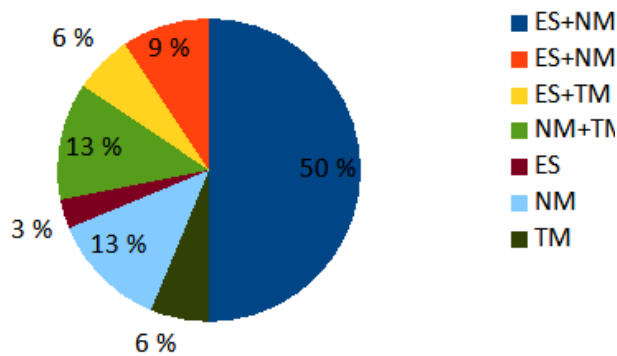
Seule une minorité des espèces séquencées plus de 10 fois ont été trouvées par chaque récolteur (Figure 13). En effet, seulement 38% (n=66) en moyenne de ces espèces ont été trouvées par les trois récolteurs. On peut aussi remarquer que la différence de quantité d'espèces prélevées entre les

récolteurs est assez faible pour chaque lieu, à l'exception du lieu 3, où NM a récolté plus d'espèces uniques que les deux autres récolteurs. On peut aussi voir qu'une forte proportion d'espèces (68%, n=66) a été récoltée par au moins deux récolteurs pour chaque lieu.

Ces chiffres considèrent toutes les espèces avec plus de 10 séquençages, cela inclut de très nombreuses espèces avec un faible nombre de séquences qui ne correspondent probablement pas aux morceaux de thalles que nous avons ajoutés dans nos tubes, mais à des fragments qui s'y étaient accrochés, à des spores, des contaminants ou des artéfacts. En étudiant les espèces ayant été séquencées un plus grand nombre de fois, les données devraient correspondre principalement aux espèces dont les thalles ont effectivement été récoltés.

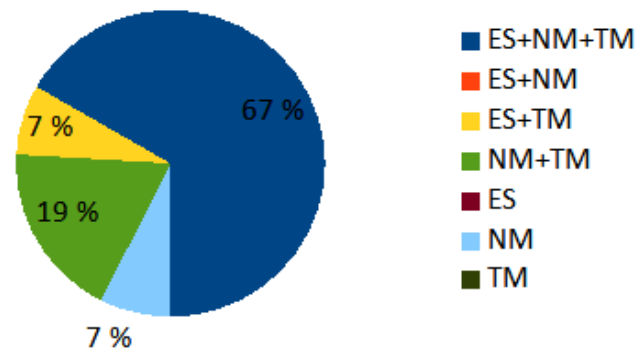
7.B Recouvrement des OTU séquencées plus de 1 000 fois

Recouvrement entre récolteurs lieu 1



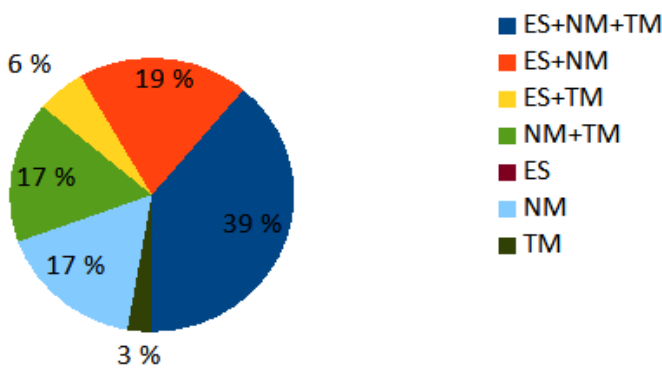
A.

Recouvrement entre récolteurs lieu 2



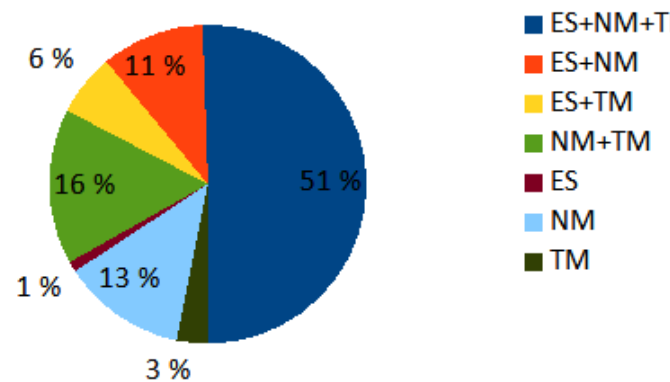
B.

Recouvrement entre récolteurs lieu 3



C.

Recouvrement tout lieux compris



D.

Fig. 14 Répartition des espèces avec plus de 1000 séquences en fonction de qui les a récoltées, avec pour chaque part le pourcentage qu'elle représente. A. Lieu 1, B. Lieu 2, C. Lieu 3 et D. la moyenne des trois lieux. ES+NM+TM représente les espèces récoltées par tous les récolteurs. ES+NM représente les espèces trouvées uniquement par Emmanuël Sérusiaux et Nicolas Magain. ES+TM pour Emmanuël Sérusiaux et Timothée Michaux, NM+TM pour Nicolas Magain et Timothée Michaux. ES, NM et TM pour les espèces trouvées seulement par un seul récolteur.

L'augmentation du nombre minimum de séquences par OTU a permis d'augmenter le recouvrement des différents récolteurs (Figure 14). On peut voir une plus grande proportion d'OTU trouvées par tous les récolteurs, 50% pour le lieu 1, 67% pour le lieu 2 et 39% pour le lieu 3 pour une moyenne de 51% des OTU récoltés par tous, ainsi qu'une plus grande variabilité dans les résultats. Le pourcentage d'OTU trouvées par deux récolteurs ou plus est aussi plus élevé avec en moyenne seulement 16% des OTU n'étant récoltées que par un seul récolteur.

7.C Recouvrement des OTU séquencés plus de 10 000 fois.

Recouvrement par récolteurs tout lieux compris

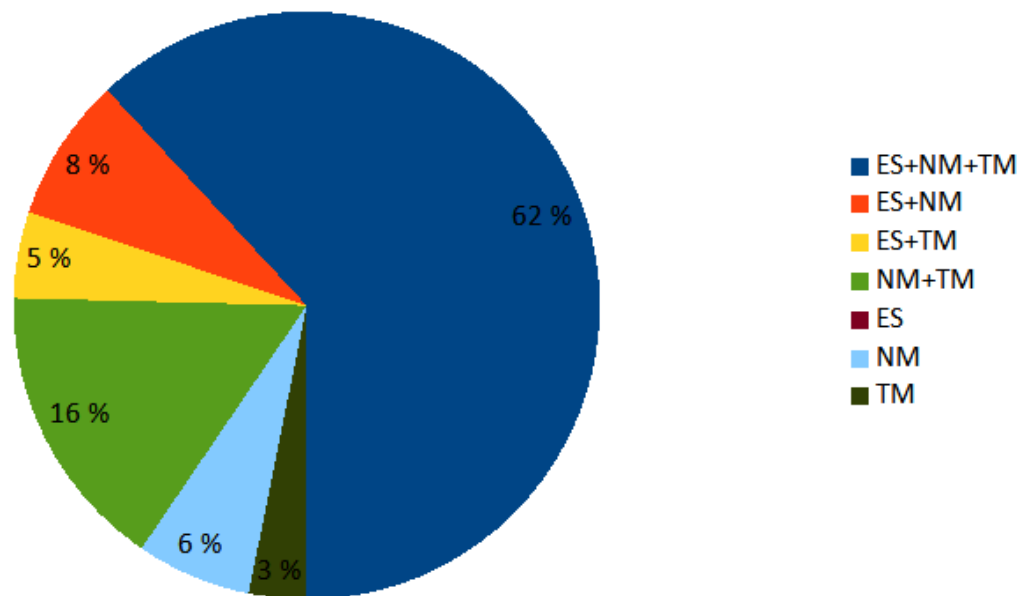
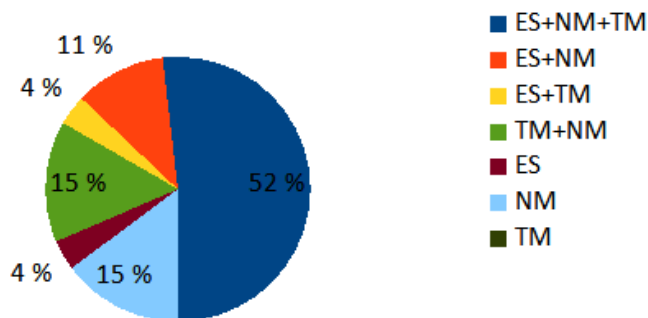


Fig. 15 Graphique en camembert de la répartition des espèces avec plus de 10 000 séquences en fonction de qui les a récoltées, avec pour chaque part le pourcentage qu'elle représente. Ce graphique est fait grâce aux moyennes des données des trois lieux. ES+NM+TM représente les espèces récoltées par tous les récolteurs. ES+NM représente les espèces trouvées uniquement par Emmanuël Sérusiaux et Nicolas Magain. ES+TM pour Emmanuël Sérusiaux et Timothée Michaux, NM+TM pour Nicolas Magain et Timothée Michaux. ES, NM et TM pour les espèces trouvées seulement par un seul récolteur.

En ne considérant que les OTU représentées par au moins 10 000 séquences, on observe un recouvrement plus élevé des espèces récoltées, avec 62% des espèces ayant été récoltées par les trois récolteurs et 91% des espèces ayant été trouvées par deux récolteurs ou plus (Figure 15).

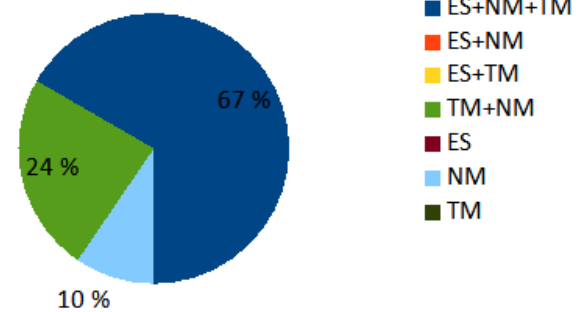
7.D Recouvrement des espèces vérifiées.

Recouvrement des espèces vérifiées en fonction du récolteur lieu 1



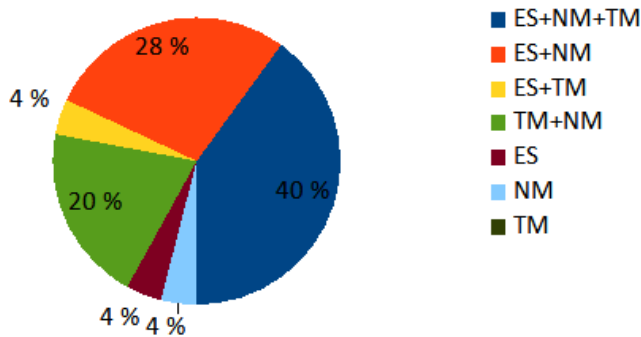
A.

Recouvrement des espèces vérifiées en fonction du récolteur lieu 2



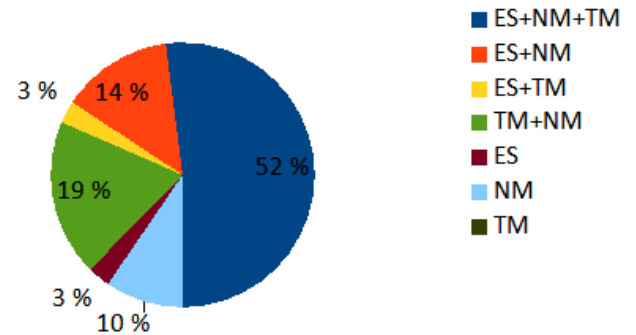
B.

Recouvrement des espèces vérifiées en fonction du récolteur lieu 3



C.

Recouvrement des espèces vérifiées tout lieux compris



D.

Fig. 16 Graphique en camembert de la répartition des espèces vérifiées en fonction de qui les a récolté, avec pour chaque part le pourcentage qu'elle représente. A. Montre les espèces trouvées dans le lieu 1, B. Celles du lieu 2, C. Celles du lieu 3 et D, la moyenne des trois lieux. ES+NM+TM représente les espèces récoltées par tous les récolteurs. ES+NM représente les espèces trouvées uniquement par Emmanuël Sérusiaux et Nicolas Magain. ES+TM pour Emmanuël Sérusiaux et Timothée Michaux, NM+TM pour Nicolas Magain et Timothée Michaux. ES, NM et TM pour les espèces trouvées seulement par un seul récolteur.

Le recouvrement pour les espèces vérifiées (dont l'identification morphologique a été confirmée sur base des photos) est assez similaire à celui des espèces séquencées 1 000 fois ou plus. En effet la

moyenne d'espèces récoltées par chaque récolteur est de 52 % soit 1% de plus que pour les OTU séquencés plus de 1 000 fois (fig. 14). De plus, on remarque comme sur les autres figures que le lieu 2 a un recouvrement significativement plus grand que les lieu 1 et 3. La similarité entre ces graphiques et ceux de la fig. 14 vient sûrement du fait que la quasi-totalité des espèces vérifiées ont été séquencé plus de 1 000 fois.

8. Courbe d'accumulation

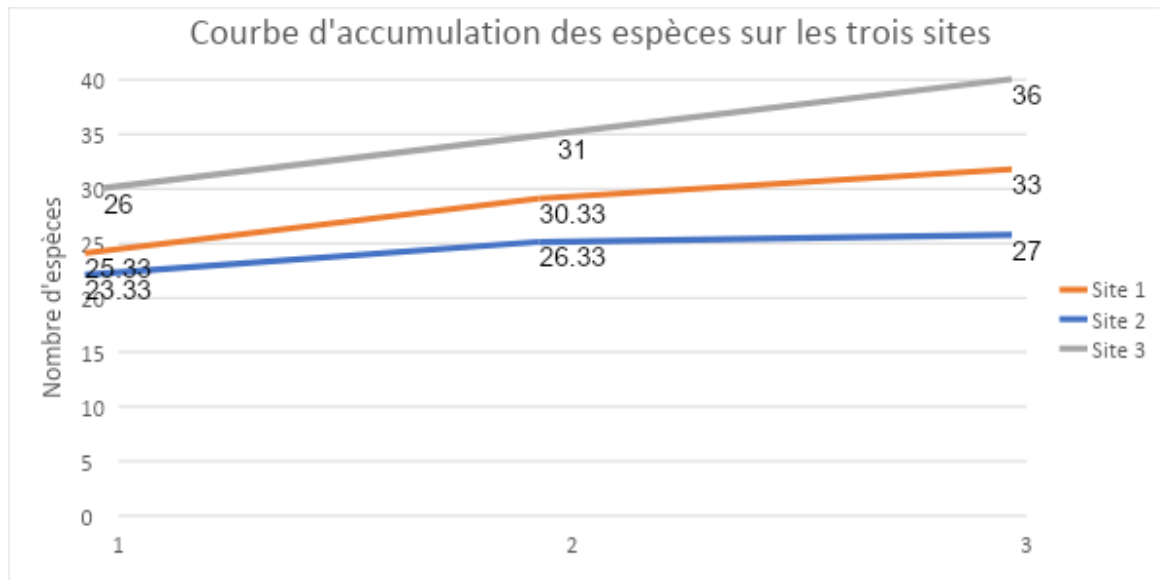


Fig. 17 Courbe d'accumulation du nombre d'espèces sur chacun des 3 sites en considérant les 3 récoltes comme 3 échantillons indépendants et avec, pour chaque courbes, 3 permutations. Les valeurs indiquées sont la moyenne des 3 permutations.

En représentant le nombre d'espèces récoltées par chacun des trois collecteurs sous forme de courbe d'accumulation, on peut voir que l'on semble loin d'avoir atteint le total de la diversité de chaque site, en particulier dans les sites 1 et 3, plus riches en espèces.

A ce stade, nous pouvons tenter de répondre aux questions de recherche 3 et 4 :

3. *Combien de temps faut-il passer sur le terrain pour espérer récolter l'essentiel de la diversité d'un site ?*

Vu les recouvrements partiels entre les espèces récoltées par les différents collecteurs (Figures 13-16), il est clair qu'une durée d'une heure est insuffisante pour espérer collecter la diversité totale d'un site, même d'une surface de 50m x 50m. Il faudrait passer un temps nettement plus conséquent pour espérer obtenir des valeurs de recouvrement plus importantes. Il faut aussi garder à l'esprit que la liste obtenue représente les espèces présentes dans la zone de 50m x 50m et non pas sur l'ensemble du site naturel choisi.

4. *Est-il important que la récolte soit faite par un récolteur expérimenté ? Est-ce qu'une connaissance importante en lichénologie est requise pour obtenir l'essentiel de la diversité d'un site, ce qui ne résoudrait alors pas le problème du manque d'expertise cité plus haut, ou est-ce que tout biologiste de terrain obtient le même type de résultat ?*

Pour cette question, la réponse doit être nuancée. En effet, le nombre d'espèces récoltées par ES (très expérimenté) et TM (débutant) est similaire sur l'ensemble des sites, alors que NM (expérimenté) a récolté plus d'espèces dans les 2 sites plus riches en espèces (Figure 11).

9. Résumé des résultats

Ce protocole a donc mis en place une récolte dans 3 lieux différents, par 3 récolteurs différents pour un total de 9 échantillons. Ces 9 échantillons ont été séquencés par amplicon sequencing en utilisant l'ITS2. Ce séquençage a permis de produire 1 487 879 séquences de champignons qui ont pu être regroupés en 257 OTU. Après nettoyage et élimination des doublons et des OTU séquencés moins de 10 fois (considérés comme des contaminations), un total de 89 OTU sont exploitables. Le nombre d'OTU récoltés par récolteur et par lieu est sensiblement similaire partout.

Parmi ces OTU le taux de recouvrement par site (OTU récolté par tous les récolteurs) est de 36% (n=89). Cette valeur est dépendante du seuil d'exclusion des OTU considérés comme contaminations. En effet, le taux de recouvrement augmente significativement quand le nombre de séquençage minimum augmente, jusqu'à atteindre 62% (n= 23) quand on ne prend en compte que les OTU séquencés plus de 10,000 fois.

Grâce aux photos des échantillons récoltés, la quasi-totalité des espèces récoltées "volontairement" ont été identifiées indépendamment de l'identification ADN. Toutes les espèces ainsi vérifiées ont aussi été séquencées, ce qui suggère que notre amplicon sequencing a séquencé l'entièreté de nos morceaux de thalles. Deux études récentes (Gueidan et al. 2019, Gueidan et al. 2022) ayant utilisé l'amplicon sequencing pour obtenir les séquences ITS de 96 et 384 échantillons d'herbier, respectivement, ont obtenu la séquence de 88,5% et 86.5% d'entre eux. Mon plus grand taux d'amplification peut être dû à la fraîcheur de mes échantillons, à la technologie utilisée (Illumina MiSeq vs PacBio), et au fait que je n'ai pas inclus de lichens saxicoles, plus difficiles à séquencer.

Parmi les 89 OTU sélectionnés, seules 32% des espèces ont été identifiées sur les photos. Similairement au recouvrement, le seuil de sélection des OTU influe fortement sur la proportion d'espèces identifiées, jusqu'à atteindre 78% (n=23) des OTU séquencées pour les OTU séquencés plus de 10,000 fois. Des études précédentes ont déjà mis en évidence l'identification d'un nombre plus important d'espèces par séquençage que par identification morphologique (Wright et al. 2019).

10. Le protocole fonctionne-t-il?

Tous ces résultats nous permettent d'affirmer plusieurs choses. Tout d'abord il semblerait que l'utilisation de l'amplicon sequencing afin d'identifier des lichens est un succès, avec un total de 264 OTU de champignons lichénisés, l'amplicon sequencing a permis de mettre en évidence une multitude d'espèces. Grâce à l'identification des photos des échantillons récoltés, il semblerait aussi que quasiment toutes les espèces récoltées aient été séquencées. Dans nos photos figuraient les genres *Candelariella* (Candelariomycètes) et *Normandina* (Eurotiomycètes), dont nous avons vérifié la présence dans les jeux de données correspondant à ces classes.

Le protocole a aussi permis de séquencer bien plus d'espèces que celles récoltées : de nombreuses espèces de champignons lichénisés, mais aussi des algues, des champignons endophytes ou parasites (présents dans les lichens ou dans l'environnement adjacent ou sur le substrat) et sans doute des spores. Ces résultats ne sont pas surprenants mais le manque de discrimination du séquençage complexifie grandement l'analyse des résultats. Une solution serait d'utiliser des primers spécifiques aux Lecanoromycètes, ce qui éliminerait la plupart des champignons non-lichénisés. Cependant, cela entraînerait aussi la disparition des champignons lichénisés appartenant à d'autres classes, comme les Eurotiomycètes, Arthoniomycètes et Candelariomycètes.

La question de savoir s'il faudrait inclure dans un inventaire les espèces détectées de façon non ambiguë par séquence d'ADN (après filtrage des artéfacts) mais non détectées visuellement sur le terrain n'est pas triviale. En effet, ces espèces sont vraisemblablement présentes physiquement sur le site, mais peut-être sous forme de spores ou d'hyphes n'ayant pas formé de thalle, ou un thalle minuscule qui ne se développera jamais, et ne participe donc pas vraiment de la richesse lichénique du lieu.

11. Est-il efficace?

Le protocole est donc capable d'extraire une liste d'espèces de lichens à partir d'un seul séquençage de thalles récoltés. Il est aussi capable d'identifier toutes les espèces récoltées. Mais est-il efficace?

Bien que toutes les espèces récoltées soient identifiées, de nombreuses espèces non récoltées sont aussi présentes dans les résultats. Ces espèces, bien que probablement présentes dans l'environnement, rendent les résultats confus et forcent l'intervention d'une analyse classique des échantillons pour déterminer avec certitude quelles espèces ont été récoltées. Dans notre cas, la vérification des résultats est possible grâce aux photos prises de chaque échantillon le jour de la récolte. Cependant, ce travail supplémentaire retire les bénéfices de l'analyse génétique et oblige à recourir à l'expert. Certaines séquences d'ADN produites sont peut-être aussi des artéfacts. Ces difficultés ont déjà été soulignées lors de l'utilisation d'amplicon sequencing pour séquencer des champignons lichénisés (Mark et al. 2016).

L'un des objectifs de ce travail est de regarder l'impact de l'expérience du récolteur sur la diversité des échantillons récoltés. Il semblerait que l'expérience du récolteur ne soit pas un facteur essentiel. Dans notre cas, les deux récolteurs les plus expérimentés ont récolté en moyenne par récolteur 12% d'espèces uniques là où le récolteur sans expérience en a récolté 6%. De plus 52% des espèces vérifiées ont été récoltées par les trois récolteurs. L'expérience joue donc un rôle important mais ne semble pas nécessaire à la réalisation de l'inventaire. Vondrak et al. (2016) ont déjà montré que les inventaires par des lichénologues seuls étaient moins exhaustifs que ceux réalisés par plusieurs récolteurs mis en compétition.

Le fait que quasiment tout le traitement bioinformatique utilise un seul programme, Mothur, qui ne nécessite pas de compétences en programmation ni de capacités de calcul informatique très importantes le rend utilisable par n'importe quel biologiste avec un minimum d'expérience sur un ordinateur. Cependant, à ce stade, les résultats restent difficiles à interpréter notamment au vu du grand nombre d'espèces séquencées un petit nombre de fois. Le protocole pourrait être amélioré en filtrant automatiquement les OTU séquencées en dessous d'un certain seuil, et en adaptant les paramètres de clustering des OTU pour éviter que le programme ne délimite un nombre artificiellement trop important d'espèces. Les vérifications par BLAST peuvent se faire directement sur le site internet du NCBI, et ne sont pas nécessaires pour les espèces courantes. Il s'agit d'une vérification supplémentaire de notre part pour tester l'efficacité du protocole, mais qui n'est pas requise pour obtenir les identifications taxonomiques, qui peuvent être obtenues directement avec Mothur.

Le séquençage pouvant être également réalisé par une tierce partie, la seule partie nécessitant un équipement particulier est l'extraction d'ADN, qui pourrait même elle aussi être confiée à un tiers.

Cependant, pour obtenir un inventaire exhaustif ou en tout cas suffisamment complet d'un lieu, il sera nécessaire que le récolteur passe un temps nettement plus conséquent à la récolte des morceaux de thalles. Il serait intéressant de tester le même protocole en récoltant pendant trois ou quatre heures.

12. Est-il possible de développer un pipeline d'analyse des résultats suffisamment simple pour qu'il soit utilisé par une personne ayant des connaissances limitées en bio-informatique ?

Nous avons développé l'ensemble du pipeline avec des programmes simples d'utilisation. L'essentiel des données ont été analysées avec Mothur, qui ne demande pas de compétences en programmation, et les vérifications par BLAST peuvent se faire sur le site internet du NCBI. Il est donc raisonnable de penser que ce pipeline pourrait être utilisé par tout biologiste n'ayant pas de connaissances particulières en bioinformatique.

Le séquençage pouvant être également réalisé par une tierce partie, la seule partie nécessitant un équipement particulier est l'extraction d'ADN.

13. Quel est le coût par récolte ?

Le séquençage de 9 échantillons par la compagnie Microsynth a coûté 618 EUR, à quoi il faut ajouter les tubes et sachets plastiques, l'extraction d'ADN, l'envoi du matériel par colis. On peut estimer que le coût total par échantillon était d'environ 70 EUR.

L'espèce prise en photo (et donc volontairement mise dans un tube) pour lequel le plus petit nombre de séquences a été récolté est *Peltigera praetextata*, avec 870 séquences. On peut donc considérer qu'en diminuant la profondeur de séquençage par 3 ou par 5 (et donc en incluant plus d'échantillons par run de MiSeq), on aurait toujours obtenu suffisamment de reads pour séquencer tout ce qui a été volontairement mis dans le tube. Une profondeur de séquençage plus faible permettrait aussi sans doute d'avoir moins de « bruit » dans les données puisque certains organismes présents sous formes de spores ou minuscules fragments et qui ont été séquencés moins de 10 fois à la profondeur de séquençage actuelle n'auraient pas été séquencés. Une profondeur de séquençage moindre permettrait de réduire encore le coût par échantillon.

Ce prix de 70 EUR correspond plus ou moins au tarif horaire pratiqué par les bureaux d'études en Wallonie pour les expertises biologiques (N. Magain, comm. pers.). On peut imaginer que l'identification morphologique de 25 à 30 espèces de lichens par un expert prendrait au minimum une heure, sans doute bien davantage. Le prix de l'analyse génétique ne paraît donc pas disproportionné, voire compétitif.

En revanche, le temps de récolte sur le terrain devra être augmenté pour espérer réaliser un relevé exhaustif d'une zone, ce qui augmentera les coûts. Cependant, ce temps nécessaire sera le même selon que cette prospection de terrain vise une identification morphologique ou génétique.

Le protocole devra être amélioré en affinant les paramètres des analyses pour éviter les artéfacts, et en filtrant mieux les données, pour obtenir une liste d'espèces qui correspond à ce qui a été récolté, sans la grande quantité de « bruit » correspondant à des espèces séquencées un petit nombre de fois mais pas volontairement récoltées.

Conclusion

En résumé, cette étude a démontré que l'amplicon sequencing fonctionnait pour obtenir des inventaires de lichens en Wallonie à partir d'un tube contenant des morceaux de tous les échantillons récoltés. Il est possible d'obtenir la liste des champignons lichénisés présents, et ce pour un coût raisonnable. Le protocole bioinformatique est simple d'utilisation. En revanche, la partie bioinformatique devra encore être améliorée pour mieux éliminer les contaminants et le bruit dans les données. Le temps passé sur le terrain devra également être nettement plus conséquent (plusieurs heures) pour espérer récolter une partie conséquente de la diversité lichénique présente, ce qui peut réduire la faisabilité du protocole.

Bibliographie

1. Ahmadjian, V. The Lichen Photobiont: What Can It Tell Us about Lichen Systematics? *The Bryologist* **96**, 310–310 (1993).
2. Allen, J. L., McMullin, R. T., Tripp, E. A. & Lendemer, J. C. Lichen conservation in North America: a review of current practices and research in Canada and the United States. *Biodivers. Conserv.* 2019 2812 **28**, 3103–3138 (2019).
3. Andrews, S. FastQC: A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data [Online]. <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/> (2010)
4. Aschenbrenner, I. A., Cernava, T. Berg, G. & Grube, M. Understanding microbial multi-species symbioses. *Front. Microbiol.* **7**, 180–180 (2016).
5. Asta, J., Ferretti, M. & Fornasier, MF. European guideline for mapping lichen diversity as an indicator of environmental stress. The British Lichen Society. 1-20 (2002).
6. Belnap, J. The world at your feet : desert biological soil crusts. *Frontiers in ecology and the environment* 1-4, 181-189 (2003).
7. Bokulich, N. A. *et al.* Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing. *Nat. Methods* 2012 101 **10**, 57–59 (2013).
8. Bruteig, I. E. The epiphytic lichen hypogymnia physodes as a biomonitor of atmospheric nitrogen and sulphur deposition in Norway. *Environ. Monit. Assess.* **26**, 27–47 (1993).
9. Conti, M. E. & Cecchetti, G. *Biological monitoring: lichens as bioindicators of air pollution assessment a review.* www.elsevier.com/locate/envpol.
10. Crespo, A. & Thorsten Lumbsch, H. Cryptic species in lichen-forming fungi. *IMA Fungus* **1**, 167–170 (2010).
11. Cruaud, P., Rasplus, J. Y., Rodriguez, L. J. & Cruaud, A. High-throughput sequencing of multiple amplicons for barcoding and integrative taxonomy. *Sci. Rep.* 2017 71 **7**, 1–12 (2017).

12. Cubero, O. F., Crespo, A., Fatehi, J. & Bridge, P. D. DNA extraction and PCR amplification method suitable for fresh, herbarium-stored, lichenized, and other fungi. *Plant Syst. Evol.* **216**, 243–249 (1999).
13. Culberson, C. F., & Kristinsson, H. D. (1970). A standardized method for the identification of lichen products. *Journal of Chromatography A*, *46*(C), 85–93.
[https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)83967-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)83967-9)
14. Darwin, E. *The botanic garden. A poem, in two parts. Part I. Containing the economy of vegetation. Part II. The loves of the plants. : With philosophical notes.*
15. Diederich, P., D. Ertz, N. Stapper, E. Sérusiaux, D. Van den Broeck, P. van den Boom & C. Ries. - The lichens and lichenicolous fungi of Belgium, Luxembourg and northern France. 2023
<http://www.lichenology.info>
16. Friedmann, E. I. Endolithic Microorganisms in the Antarctic Cold Desert. *Science* **215**, 1045–1053 (1982).
17. Frisch, A. *et al.* New and noteworthy lichens and lichenicolous fungi from Norway. *1-47* (2020).
18. Gaya, E. *et al.* The adaptive radiation of lichen-forming Teloschistaceae is associated with sunscreens pigments and a bark-to-rock substrate shift. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, 11600–11605 (2015).
19. Gerhardt, A. Bioindicator Species and their Use in Biomonitoring. *Environmental Monitoring—Vol. I—Bioindicator Species and Their Use in Biomonitoring, Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS)*. (2022)
20. Gheza, G. *et al.* Towards a Red List of the terricolous lichens of Italy.
<https://doi.org/10.1080/11263504.2022.2065379> **156**, 824–825 (2022).

21. Gibson, M. D. *et al.* The spatial and seasonal variation of nitrogen dioxide and sulfur dioxide in Cape Breton Highlands National Park, Canada, and the association with lichen abundance. *Atmos. Environ.* **64**, 303–311 (2013).
22. Gueidan, C., Elix, J. A., McCarthy, P. M., Roux, C., Mallen-Cooper, M., & Kantvilas, G. PacBio amplicon sequencing for metabarcoding of mixed DNA samples from lichen herbarium specimens. *MycoKeys*, 53, 73. (2019)
23. Gueidan, C., & Li, L. A long-read amplicon approach to scaling up the metabarcoding of lichen herbarium specimens. *MycoKeys*, 86, 195. <https://doi.org/10.3897/MYCOKEYS.86.77431> (2022)
24. Harutyunyan, S., Wiesmair, B. & Mayrhofer, H. Catalogue of the Lichenized Fungi in Armenia. *Herzogia* **24**, 265–296 (2011).
25. Hugerth, L. W. & Andersson, A. F. Analysing microbial community composition through amplicon sequencing: From sampling to hypothesis testing. *Front. Microbiol.* **8**, 274218–274218 (2017).
26. Johansson, O., Palmqvist, K. & Olofsson, J. Nitrogen deposition drives lichen community changes through differential species responses. *Glob. Change Biol.* **18**, 2626–2635 (2012).
27. Kerr, J. T. & Cihlar, J. PATTERNS AND CAUSES OF SPECIES ENDANGERMENT IN CANADA. *Ecol. Appl.* **14**, 743–753 (2004).
28. Kircher, M., & Kelso, J. (2010). High-throughput DNA sequencing – concepts and limitations. *BioEssays*, 32(6), 524–536. <https://doi.org/10.1002/BIES.200900181>
29. Kirk, P. M. C. P., Cannon, P. F., Minter, D. W., & Stalpers, J. A. (Eds.). (2008). Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi. Cabi.
30. Leavitt, S. D. *et al.* DNA barcode identification of lichen-forming fungal species in the *Rhizoplaca melanophthalma* species-complex (Lecanorales, Lecanoraceae), including five new species. *MycoKeys* 7 1-22 7, 1–22 (2013).

31. LeBlanc, S.C.F. *et al.* *Relation between industrialization and the distribution and growth of epiphytic lichens and mosses in Montreal, Canadian Journal of Botany.* (1970) doi :
10.1139/B70-224
32. Lücking, R., Hodkinson, B., & Leavitt, S. The 2016 classification of lichenized fungi in the Ascomycota and Basidiomycota – Approaching one thousand genera, *The Bryologist*, 119(4), 361-416, (2017)
33. Lundberg, D. S., Yourstone, S., Mieczkowski, P., Jones, C. D. & Dangl, J. L. Practical innovations for high-throughput amplicon sequencing. *Nat. Methods* 2013 1010 **10**, 999–1002 (2013).
34. Lutzoni, F. & Miadlikowska, J. Lichens. *Curr. Biol.* **19**, (2009).
35. Lutzoni, F., Pagel, M. & Reeb, V. Major fungal lineages are derived from lichen symbiotic ancestors. *Nat.* 2001 4116840 **411**, 937–940 (2001).
36. Magain, N., Miadlikowska, J., Goffinet, B., Goward, T., Pardo de la Hoz, C. J., Juriado, I. & Sérusiaux, E. High species richness in the lichen genus *Peltigera* (Ascomycota, Lecanoromycetes): 34 species in the dolichorhizoid and scabrosoid clades of sect. *Polydactylon*, including 24 new to science. *Persoonia*. (2023)
37. Mark, K., Cornejo, C., Keller, C., Flück, D. & Scheidegger, C. Barcoding lichen-forming fungi using 454 pyrosequencing is challenged by artifactual and biological sequence variation. in vol. 59 685–704 (Canadian Science Publishing, 2016).
38. Marthinsen, G., Rui, S. & Timdal, E. OLICH: A reference library of DNA barcodes for Nordic lichens. *Biodivers. Data J.* **7**, (2019).
39. Nascimbene, J., Nimis, P. L. & Ravera, S. Evaluating the conservation status of epiphytic lichens of Italy: A red list. *Plant Biosyst.* **147**, 898–904 (2013).
40. Nash III, T. H. *Lichen Biology Second Edition.* (1996).
41. Nash III, T. H. N. Sensitivity of Lichens to Sulfur Dioxide. *The Bryologist* **76**, 333–333 (1973).

42. NATO report. Monitoring with Lichens — Monitoring Lichens. (Springer Netherlands, 2002).
doi:10.1007/978-94-010-0423-7.
43. Nilsson, R. H., Larsson, K. H., Taylor, A. F. S., Bengtsson-Palme, J., Jeppesen, T. S., Schigel, D., Kennedy, P., Picard, K., Glöckner, F. O., Tedersoo, L., Saar, I., Kõljalg, U., & Abarenkov, K. (2019). The UNITE database for molecular identification of fungi: handling dark taxa and parallel taxonomic classifications. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D259–D264.
<https://doi.org/10.1093/NAR/GKY1022>
44. Park, S. Y., Jang, S. H., Oh, S. O., Kim, J. A., & Hur, J. S. (2018). An Easy, Rapid, and Cost-Effective Method for DNA Extraction from Various Lichen Taxa and Specimens Suitable for Analysis of Fungal and Algal Strains. *https://Doi.Org/10.5941/MYCO.2014.42.4.311*, 42(4), 311–316.
45. Prieto, Maria; Schultz, Matthias; Olariaga, Ibai; Wedin, Mats. "Lichinodium is a new lichenized lineage in the Leotiomycetes". *Fungal Diversity*. 94 (1): 23–39 (2018)
46. Pykälä, J. Habitat loss and deterioration explain the disappearance of populations of threatened vascular plants, bryophytes and lichens in a hemiboreal landscape. *Glob. Ecol. Conserv.* **18**, e00610–e00610 (2019).
47. Ranta, P. Changes in urban lichen diversity after a fall in sulphur dioxide levels in the city of Tampere, SW Finland. *Annales Botanici Fennici*, 38(4), 295–304. (2001).
<http://www.jstor.org/stable/23726705>
48. Richardson, D. H. S. Understanding the pollution sensitivity of lichens. *Bot. J. Linn. Soc.* **96**, 31–43 (1988).
49. Rognes, T., Flouri, T., Nichols, B., Quince, C., & Mahé, F. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ*, 4, e2584.(2016)

50. Schloss PD et al. Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology* 75:7537–7541. (2009)
51. Schloss, P. D., Westcott, S. L., Ryabin, T., Hall, J. R., Hartmann, M., Hollister, E. B., ... & Weber, C. F. . Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and environmental microbiology*, 75(23), 7537-7541.(2009)
52. Schoch, C. L. *et al.* Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 6241–6246 (2012).
53. Schöler, A., Jacquiod, S., Vestergaard, G., Schulz, S. & Schloter, M. Analysis of soil microbial communities based on amplicon sequencing of marker genes. *Biol. Fertil. Soils* **53**, 485–489 (2017).
54. Sérusiaux, E., Diederich, P & Lambinon, J. *Ferrantia*: Les macrolichens de Belgique, du Luxembourg et du nord de la France: clés de détermination. *Ferrantia* **40**, (2004)
55. Shokralla, S. *et al.* Massively parallel multiplex DNA sequencing for specimen identification using an Illumina MiSeq platform. *Sci. Rep. 2015* **5**, 1–7 (2015).
56. Sierra, M. A. *et al.* The Microbiomes of Seven Lichen Genera Reveal Host Specificity, a Reduced Core Community and Potential as Source of Antimicrobials. *Front. Microbiol.* **11**, 398–398 (2020).
57. Spribille, T. *et al.* Lichens and associated fungi from Glacier Bay National Park, Alaska. *The Lichenologist* **52**, 61–181 (2020).
58. Spribille, T. *et al.* 3D biofilms: in search of the polysaccharides holding together lichen symbioses. *FEMS Microbiol. Lett.* **367**, 23–23 (2020).
59. Thorsten Lumbsch, H. & Leavitt, S. D. Goodbye morphology? A paradigm shift in the delimitation of species in lichenized fungi. *Fungal Divers.* **50**, 59–72 (2011).

60. Vondrák, J. *et al.* Methods for obtaining more complete species lists in surveys of lichen biodiversity. *Nord. J. Bot.* **34**, 619–626 (2016).
61. Will-Wolf, S., Scheidegger, C. & McCune, B. Methods for Monitoring Biodiversity and Ecosystem Function. *Monit. Lichens — Monit. Lichens* 147–162 (2002)
doi:10.1007/978-94-010-0423-7_11.
62. Waugh, J. (2007). DNA barcoding in animal species: progress, potential and pitfalls. *BioEssays*, 29(2), 188–197. <https://doi.org/10.1002/BIES.20529>
63. Wright, B., St. Clair, L. L. & Leavitt, S. D. Is targeted community DNA metabarcoding suitable for biodiversity inventories of lichen-forming fungi? *Ecol. Indic.* **98**, 812–820 (2019).
64. Wright, B., St. Clair, L. L. & Leavitt, S. D. Is targeted community DNA metabarcoding suitable for biodiversity inventories of lichen-forming fungi? *Ecol. Indic.* **98**, 812–820 (2019).
65. Xu, J. Fungal DNA barcoding1. *Genome* **59**, 913–932 (2016).
66. Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L. & Miller, W. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J. Comput. Biol. J. Comput. Mol. Cell Biol.* **7**, 203–214 (2000).

Annexes

Annexe 1

Tableau de toutes les espèces vérifiées morphologiquement avec leurs nombre de séquençage leurs lieux de récolte ainsi que leurs récolteurs

Nombre de séquences	ES1	NM1	TM1	ES2	NM2	TM2	ES3	NM3	TM3	Total	Nom de l'espèce
148943	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9 <i>Parmelia sulcata</i>
144848	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9 <i>Physcia adscendens</i>
118824	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9 <i>Flavoparmelia caperata</i>
105240	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9 <i>Lecidella elaeochroma</i>
91224	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9 <i>Punctelia subrudecta</i>
78091	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	8 <i>Cladonia fimbriata</i>
66711	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	8 <i>Physconia enteroxantha</i>
59196	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9 <i>Lecanora chlorotera</i>
51321	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	7 <i>Melanelixia glabrata</i>
47570	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	8 <i>Xanthoria parietina</i>
32957	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	7 <i>Evernia prunastri</i>
28771	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9 <i>Phlyctis argena</i>
27544	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	3 <i>Hypogymnia physodes</i>
26002	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9 <i>Phaeophyscia ciliata</i>
16462	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	8 <i>Phaeophyscia orbicularis</i>
15156	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	5 <i>Parmotrema perlatum</i>
13757	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	5 <i>Parmelina tiliacea</i>
13233	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	4 <i>Ramalina farinacea</i>
8805	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	3 <i>Lepraria finkii</i> <i>Pseudoschismatomma</i>
6813	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9 <i>rufescens</i>
5421	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	5 <i>Lepraria incana</i>
3176	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	4 <i>Lecanora carpinea</i>
2553	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	5 <i>Lecanora compallens</i>
2345	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	6 <i>Lecanora expallens</i>
2080	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	4 <i>Lepraria rigidula</i>
583	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	2 <i>Lecidella albida</i>
400	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	3 <i>Physconia grisea</i>

Annexe 2

Tableau des OTU séquencés plus de 10 fois avec leurs nombre de séquençage leurs lieux de récolte ainsi que leurs récolteurs

Nombre de séquences	ES1	NM1	TM1	ES2	NM2	TM2	ES3	NM3	TM3	Total	Nom de l'espèce
148943	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9 <i>Parmelia sulcata</i>
144848	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9 <i>Physcia adscendens</i>
118824	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9 <i>Flavoparmelia caperata</i>
105240	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9 <i>Lecidella elaeochroma</i>
91224	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9 <i>Punctelia subrudecta</i>
78091	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	8 <i>Cladonia fimbriata</i>
66711	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	8 <i>Physconia enteroxantha</i>
59196	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9 <i>Lecanora chlorotera</i>
51321	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	7 <i>Melanelixia glabrata</i>
47570	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	8 <i>Xanthoria parietina</i>
33327	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	7 <i>Hypotrachyna afrorevoluta</i>
32957	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	7 <i>Evernia prunastri</i>
28771	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9 <i>Phlyctis argena</i>
27544	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	3 <i>Hypogymnia physodes</i>
26002	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9 <i>Phaeophyscia ciliata</i>
24375	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9 <i>Hypotrachyna revoluta</i>
22317	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	5 <i>Cladonia humilis</i>
16462	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	8 <i>Phaeophyscia orbicularis</i>
15156	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	5 <i>Parmotrema perlatum</i>
13757	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	5 <i>Parmelina tiliacea</i>
13233	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	4 <i>Ramalina farinacea</i>
11837	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1 <i>Physcia aipolia</i>
10159	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	2 <i>Rhizocarpon petraeum</i>
9032	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	2 <i>Protoparmeliopsis muralis</i>
8805	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	3 <i>Lepraria finkii</i>
8646	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	8 <i>Candelaria sp.</i>
7952	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	8 <i>Lecanora barkmaniana</i>
7621	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	5 <i>Normandina pulchella</i>
7596	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9 <i>Bacidina flavoleprosa</i>
											<i>Pseudoschismatomma</i>
6813	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9 <i>rufescens</i>
5421	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	5 <i>Lepraria incana</i>
4462	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	8 <i>Psoroglanea sp.</i>
3264	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	4 <i>Candelaria concolor</i>
3176	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	4 <i>Lecanora carpinea</i>
2553	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	5 <i>Lecanora compallens</i>
2345	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	6 <i>Lecanora expallens</i>
2213	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9 <i>Candelaria sp.</i>
2080	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	4 <i>Lepraria rigidula</i>
1575	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	8 <i>Caloplaca obscurella</i>
1528	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1 <i>Usnea esperantiana</i>
1460	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9 <i>Bacidina chlorotricula</i>
1201	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1 <i>Vanderaaea ammophilae</i>
901	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	7 <i>Candelaria xanthostigma</i>
870	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1 <i>Peltigera praetextata</i>

801	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9 <i>Scoliciosporum umbrinum</i>
738	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9 <i>Catillaria nigroclavata</i>
715	1	1	0	1	0	0	1	1	1	6 <i>Bacidina</i> sp. 3 (czech rep 2021)
651	0	1	1	1	1	1	1	1	1	8 <i>Amandinea punctata</i>
598	0	1	0	0	1	1	0	0	0	3 <i>Verrucula</i> sp.
583	0	1	1	0	0	0	0	0	0	2 <i>Lecidella albida</i>
505	1	1	1	0	1	0	0	0	1	5 <i>Melanelixia subaurifera</i>
439	0	0	1	0	0	0	0	1	0	2 <i>Diplotomma alboatrum</i>
400	1	1	0	0	0	0	1	0	0	3 <i>Physconia grisea</i>
390	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1 <i>Deltopyxis triangulispora</i>
205	1	1	1	0	1	1	1	1	1	8 <i>Micarea nowakii</i>
202	1	1	1	1	1	1	0	1	1	8 <i>Uncultured fungus</i>
178	0	1	1	1	0	1	1	1	1	7 <i>Lecania naegelii</i>
154	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9 <i>Halecania viridescens</i>
146	0	0	1	0	1	1	0	1	1	5 <i>Melanohalea exasperata</i>
117	1	1	0	1	1	1	0	1	1	7 <i>Scoliciosporum cholorococcum</i>
100	1	0	0	0	1	1	0	1	0	4 <i>Lecanora saligna</i>
91	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1 <i>Micarea microsorediata</i>
76	0	0	1	1	0	0	0	0	0	2 <i>Lecidella elaeochroma</i>
72	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1 <i>Graphis scripta</i>
59	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1 <i>Uncultured fungus</i>
58	1	1	0	1	0	1	1	1	0	6 <i>Dactylospora</i> sp.
56	1	1	0	1	1	1	1	1	0	7 <i>Uncultured fungus</i>
53	0	1	1	1	0	0	1	1	1	6 <i>Catillaria fungoides</i>
52	1	1	1	1	0	0	1	1	0	6 <i>Dactylospora</i> sp.
44	0	1	0	0	1	1	0	1	1	5 <i>Squamarina gypsacea</i>
35	1	1	0	0	1	0	1	1	1	6 <i>Micarea denigrata</i>
35	0	1	0	1	0	0	0	0	1	3 <i>Ascomycetes</i> sp.
35	0	0	0	0	0	0	1	0	1	2 <i>Arthonia helvola</i>
34	1	1	0	1	1	1	1	1	0	7 <i>Scoliciosporum cholorococcum</i>
30	0	1	0	0	1	1	1	0	1	5 <i>Arthonia mediela</i>
30	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1 <i>Buellia schaeeri</i>
28	0	0	1	0	0	0	1	1	0	3 <i>Lichenostygmatales</i>
26	1	0	0	0	0	0	1	1	0	3 <i>Uncultured Lecaronomycetes</i>
26	1	1	1	0	1	1	1	1	1	8 <i>Uncultured fungus</i>
25	0	0	0	0	1	0	0	1	0	2 <i>Lepraria elobata</i>
24	0	1	0	0	0	1	1	1	1	5 <i>Micarea denigrata</i>
24	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1 <i>Micarea czarnotae</i>
22	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2 <i>Uncultured fungus</i>
21	1	1	0	1	0	0	1	1	0	5 <i>Uncultured fungus</i>
18	0	0	1	0	0	0	0	0	1	2 <i>Lecanora subsaligna</i>
18	0	0	0	1	1	1	0	1	0	4 <i>Uncultured Lecaronomycetes</i>
18	0	1	0	1	0	1	0	1	1	5 <i>Lecania cyrtella</i>
16	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1 <i>Fellhanera bouteillei</i>
16	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1 <i>Bacidina adastrata</i>
16	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1 <i>Bacidia</i> sp.
14	0	1	0	0	0	0	0	1	1	3 <i>Rinodina colobina</i>
12	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1 <i>Biatora globulosa</i>
12	1	0	0	1	0	0	0	0	0	2 <i>Uncultured Megasporaceae</i>
12	1	0	0	1	0	1	1	0	1	5 <i>Bacidina mendax</i>
11	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1 <i>Xanthoria polycarpa</i>

Annexe 3

Lien google drive des photo prises lors de la récolte

https://drive.google.com/drive/folders/1rF_zw1_i8ziJq4AWHwLEkLd81b8mSH8f?usp=drive_link